



Doctorado en Biología Celular y Genética
Departamento de Biología



Tesis Doctoral

Generación de un modelo de Distrofia Miotónica Tipo 1 en
***Drosophila melanogaster*: caracterización y modificadores**
genéticos

Memoria presentada por

María de Haro Balcells

para optar al grado de Doctora en Biología

Directores: Dr. Juan Botas Rodríguez

Dra. Inmaculada Canal Beltrán

Madrid-España

2007

Los doctores Inmaculada Canal Beltrán, Profesora Titular de Fisiología Animal del Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid, y Juan Botas Rodríguez. Profesor Asistente del Departamento de Genética Molecular y Humana de “Baylor College of Medicine”

INFORMAN

Que la licenciada **María de Haro Balcells** ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo que presenta como memoria de Tesis Doctoral: **“Generación de un modelo de Distrofia Miotónica Tipo 1 en *Drosophila melanogaster*: caracterización y modificadores genéticos”**.

Madrid, 7 de Febrero de 2007.



Fdo. Inmaculada Canal Beltrán
Profesora Titular de Fisiología Animal
Dpto. Biología. Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid
Madrid, España

Fdo. Juan Botas Rodríguez
Profesor Asociado
Departamento de Genética
Molecular y Humana
Baylor College of Medicine
Houston, Tejas, EEUU

A mis niños,
el grande y los pequeños

Agradecimientos

La realización de este trabajo empezó realmente hace diez años cuando decidí que la Biología era realmente lo único que me gustaba. Como con todo en esta vida, hay mucha gente que me ha ayudado durante los años que han pasado desde entonces a la que me gustaría dedicarle unas líneas.

En primer lugar me gustaría agradecerles a mis padres, Toño y Maite, el apoyo y cariño incondicional que me han prestado durante todos estos años desde que empecé la carrera hasta hoy, que por fin parece que acabo de hacer las correcciones en la tesis. Gracias por estar siempre ahí durante la mudanza, boda y nacimientos que han sucedido mientras todas las investigaciones aquí descritas tenían lugar. Gracias también a mis hermanos, Toñete y Teresa, y demás familia y por supuesto a mis cuatro pedazo de abuelos, Pablo, Pilar, Gregorio y Ascensión, que son y serán siempre también el mejor ejemplo a seguir. Le agradezco también a mi familia política, Nabil, Joaqui, Yamal y Dani, todo su apoyo y su cariño. Sobre todo a Nabil por las innumerables gestiones en las que me ha ayudado.

Me gustaría agradecer a todos los amigos de la universidad su amistad en la distancia y por enseñarme la multitud de cosas a las que se puede dedicar alguien con un título en Biología: Cristina Botías, Javier Cáceres, Begoña Gamarra, Marta García, Iván Martínez, M^a Paz Morales, Rafael Núñez, Fernando Serrano y M^a Paz Talavera. Gracias Rafa por ayudarme con los trámites de la tesis y por tus correcciones más que necesarias. En especial gracias a M^a Paz Morales por ser mi mejor amiga y por pedirme siempre que vuelva a Madrid. Gracias también a José Ruiz por mantenernos a raya a M^a Paz y a mí.

En el ámbito científico me gustaría agradecerle a Inmaculada Canal la oportunidad que nos ofreció para venir a Houston por tres meses que gracias a Juan Botas se han convertido ya en casi seis años. También agradecerle a ella y a todo el laboratorio de Fisiología Animal estar ahí para lo que necesitésemos en la distancia y siempre que volvemos a casa. Gracias especialmente a Pilar Herrero por preocuparse tanto por nosotros. En cuanto a Juan, gracias por confiar en mí como persona y como científica y darme la oportunidad desarrollar mi trabajo en un laboratorio de

investigación como siempre quise. Y por supuesto por apoyarnos en todo dentro y fuera del laboratorio. Dentro del laboratorio de Juan Botas me gustaría dar las gracias a Joana Branco por su amistad y por hacer la vida en Houston mucho más llevadera. En eso también han ayudado todos los demás: Holly Cukier, Guang-Ho Cha, Beatrice de Gouyon, Alma Pérez, Laila Pillai, Eliana Romero, Onyx Sofola, Lubna Ukani y Minghang Zhang. Gracias a Eliana por enseñarme a clonar y empezar así mi aventura con la Biología Molecular, a Holly por ser mi compañera de yoga y cuidar tantas veces de mi hijo, a Onyx y Lubna por su amistad, a Alma por ser la cara más amable del laboratorio y a Minghang y a Guang-Ho por ayudarme como buenos postdocs y por sus interesantes discusiones en las comidas. Gracias a Lauren Koehler por su ayuda con los *screens* durante los veranos. Gracias en especial a Bea por confiar en nosotros, empujarnos y recibirnos siempre con los brazos abiertos. A todos gracias por enseñarme tanto sobre tantas culturas y modos de vida diferentes al nuestro.

De otros laboratorios me gustaría dar las gracias a Tom Cooper por su colaboración, a Jim Barrish por estar siempre para contestar a mis preguntas en el microscopio electrónico de barrido, a Richard Atkinson por su ayuda con el microscopio confocal y a Kwang-Wook Choi por dejarme usar el microtomo para hacer las secciones de músculo. Gracias también a Leo Pallank por dejarnos las moscas de la Ataxina 2, a Graeme Davis por las moscas MHC-GAL4 y a Mattias Mannervik por el anticuerpo anti-CBP. En especial me gustaría agradecerle a André Faustino su ayuda con los experimentos de *splicing*, pero sobre todo por su amistad.

Y por último me gustaría agradecerle y dedicarle todo este tiempo y todo este trabajo a Ismael Al-Ramahí, gracias por traerme a Houston y “obligarme” a que me quedara, por la boda, por Isaac y por el que viene en camino y sobre todo hoy por el tema que nos ocupa: por ayudarme a entender como trabajar con las moscas y a llevar a cabo todos los experimentos y todo el trabajo de los últimos ocho años que llevas acompañándome. Sabes que sin ti nada de esto tendría sentido. Y por supuesto, gracias a mi Isaac por llenar de luz todas las mañanas con su sonrisa.

“La principal enfermedad del hombre es la curiosidad inquieta de lo que no puede
conocer”

BLAISE PASCAL

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. Descripción y genética de la Distrofia Miotónica Tipo 1.....	3
2.2. Distrofia Miotónica Tipo 2	4
2.3. Modelos de patogénesis.....	5
2.3.1. Modelo de haploinsuficiencia de DMPK.....	5
2.3.2. Modelo de alteración en los niveles de expresión de genes vecinos	5
2.3.3. Modelo de ganancia de función del ARN	6
2.4. Defectos en el <i>splicing</i> alternativo en la DM1	8
2.4.1. Troponina cardiaca T.....	9
2.4.2. Receptor de la Insulina	9
2.4.3. Canal de Cloro.....	10
2.4.4. Proteína relacionada con la Miotubularina 1	11
2.4.5. Receptor de Rianodina 1 y Bomba de Ca ²⁺ dependiente de ATP del retículo sarcoplásmico/endoplásmico 1	11
2.4.6. Receptor de NMDA 1, proteína precursora amiloide β y Tau	13
2.5. Proteínas de unión a ARN implicadas en la patogénesis de la DM1	14
2.5.1. Proteínas MBNL	15
2.5.2. CUG-BP1	15
2.6. <i>Drosophila</i> como herramienta en el estudio de enfermedades humanas y búsqueda de modificadores	18
3. OBJETIVOS.....	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS	22
4.1. Sistema GAL4-UAS	22
4.2. Generación de líneas transgénicas.....	23
4.3. Microscopía electrónica de barrido de los ojos de <i>Drosophila</i>.....	28
4.4. Secciones semifinas de tórax de adulto de <i>Drosophila</i>.....	28
4.5. Hibridación <i>in situ</i> e inmunofluorescencia de músculos de larva en <i>Drosophila</i>	29
4.6. Comparación cuantitativa de núcleos con distintos tipos de fosas nucleares.....	29
4.7. Análisis del <i>splicing</i> alternativo	30

4.8. Screens genéticos para la búsqueda de modificadores	30
5. RESULTADOS	32
5.1. Caracterización de los fenotipos obtenidos con las moscas (CTG)₄₈₀	32
5.1.1. La expresión de (CTG) ₄₈₀ en el ojo de <i>Drosophila</i> causa degeneración.....	32
5.1.2. El triplete CUG expandido se acumula en fosas nucleares en los músculos larvarios de <i>Drosophila</i>	33
5.1.3. La expresión de (CTG) ₄₈₀ causa degeneración y pérdida de masa muscular en <i>Drosophila</i>	34
5.2. Alteraciones en los niveles de MBNL1 y CUG-BP1 modifican los fenotipos de las moscas (CTG)₄₈₀	36
5.2.1. Alteraciones en los niveles de la proteína Muscleblind modifican el fenotipo de ojo causado por la expresión de (CUG) ₄₈₀ en <i>Drosophila</i>	36
5.2.2. La sobre-expresión de MBNL1 suprime la toxicidad muscular inducida por la expresión de (CUG) ₄₈₀	37
5.2.3. La proteína MBNL1 co-localiza con las fosas nucleares de CUGs y modifica su número.....	39
5.2.4. El aumento de los niveles de CUG-BP1 empeora los fenotipos de ojo y de músculo inducidos por la expresión del triplete CUG expandido	40
5.3. Análisis del <i>splicing</i> alternativo en el modelo de DM1 en <i>Drosophila</i>.....	43
5.3.1. El patrón de <i>splicing</i> del gen que codifica para el Receptor de Rianodina en <i>Drosophila</i> está alterado en nuestro modelo de DM1	47
5.3.2. El patrón de <i>splicing</i> del gen CG6803 está alterado en nuestro modelo de DM1	49
5.4. Identificación de nuevos genes modificadores de la toxicidad inducida por el triplete CTG expandido.....	51
5.4.1. Screen genético dirigido con proteínas de unión a ARN.....	53
5.4.2. Screen al azar para identificar genes capaces de modificar el fenotipo por mutaciones de falta de función	68
6. DISCUSIÓN	74
6.1. El modelo de <i>Drosophila</i> reproduce fenotipos característicos de la DM1	74
6.2. MBNL1 y CUGB-P1 modulan los fenotipos de degeneración en el modelo de DM1 de <i>Drosophila</i>	76
6.3. Nuevas proteínas de unión a ARN implicadas en la enfermedad.....	78
6.4. Un screen genético no dirigido identifica nuevas rutas implicadas en la DM1 ..	84

7. CONCLUSIONES.....	86
8. BIBLIOGRAFÍA.....	87
9. APÉNDICE.....	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Región del cromosoma 19q	6
Figura 2. Las expansiones con más de 20 repeticiones de CUG forman horquillas de ARN bicatenarias	7
Figura 3. Estructura de las proteínas CELF	15
Figura 4. Modelo de patogénesis en DM1	18
Figura 5. Sistema GAL4-UAS	22
Figura 6. Vector de expresión de <i>Drosophila</i> pUAST	24
Figura 7. Caracterización de las líneas transgénicas para MBNL1	27
Figura 8. Caracterización de las líneas transgénicas para CUG-BP1	28
Figura 9. Caracterización de los fenotipos de ojo producidos por el transgén UAS-(CTG)₄₈₀ en el ojo	32
Figura 10. Fenotipo de degeneración en el ojo producido por la expresión de (CUG)₄₈₀	33
Figura 11. El ARN con el triplete expandido de CUGs se acumula en fosas nucleares en músculos de larva de <i>Drosophila</i>	34
Figura 12. La expresión de (CUG)₄₈₀ en el músculo adulto de <i>Drosophila</i> causa degeneración muscular progresiva	35
Figura 13. La sobre-expresión de (CUG)₂₀ o (CUG)₂₀₀ no causa degeneración muscular	36
Figura 14. Los niveles de Muscleblind modifican el fenotipo inducido por (CUG)₄₈₀	37
Figura 15. La sobre-expresión de MBNL1 suprime el fenotipo muscular inducido por (CUG)₄₈₀	39
Figura 16. Co-localización de la proteína MBNL1 con las fosas nucleares de CUGs	40
Figura 17. La sobre-expresión de CUG-BP1 potencia el fenotipo de ojo producido por (CUG)₄₈₀	41
Figura 18. La sobre-expresión de CUG-BP1 potencia el fenotipo de degeneración muscular inducido por (CUG)₄₈₀	42
Figura 19. CUG-BP1 no se acumula en las fosas nucleares pero es capaz de modificar su distribución	43
Figura 20. Estructura de los ARNm del <i>canal de cloro</i> (CG31116)	44

Figura 21. Estructura de los ARNm de la <i>troponina T (up)</i>	45
Figura 22. Estructura de los exones e intrones de los ARNm del gen del Receptor de Rianodina.....	46
Figura 23. Análisis del <i>splicing</i> alternativo de los exones 13 y 28 del ARNm de <i>Rya-r44F</i>.....	48
Figura 24. Las moscas (CUG)₄₈₀ presentan alteraciones en el <i>splicing</i> alternativo de los exones 13 y 28 del gen del Receptor de Rianodina.....	49
Figura 25. Estructura de los exones e intrones de los ARNm del gen de la Miofilina.....	50
Figura 26. Análisis del <i>splicing</i> alternativo del exón 4 del ARNm de <i>CG6803 (Miofilina/Zee1n1)</i>.....	51
Figura 27. Las moscas (CUG)₄₈₀ presentan alteraciones en el <i>splicing</i> alternativo del exon 4 del gen de la Miofilina/Zee1n1.....	51
Figura 28. Representación esquemática de la estrategia del <i>screen</i> genético con el modelo de DM1	53
Figura 29. La Ataxina 2 suprime el fenotipo inducido por la expresión del triplete CTG expandido.....	58
Figura 30. La falta de función del gen <i>boule (bol)</i> suprime el fenotipo de ojo inducido por la expresión de (CUG)₄₈₀ mientras que la sobre-expresión lo potencia	59
Figura 31. La sobre-expresión del gen <i>egalitarian (egl)</i> potencia el fenotipo de ojo inducido por la expresión de (CUG)₄₈₀.....	60
Figura 32. La sobre-expresión del gen <i>quaking related 58E-3 (qkr58E-3)</i> potencia el fenotipo de ojo inducido por la expresión de (CUG)₄₈₀	61
Figura 33. La falta de función del gen <i>bancal (bl)</i> potencia el fenotipo de ojo inducido por la expresión de (CUG)₄₈₀.....	62
Figura 34. La falta de función del gen <i>Int6 homologuel (Int6)</i> potencia el fenotipo de ojo inducido por la expresión de (CUG)₄₈₀	63
Figura 35. La falta de función del gen <i>nanos (nos)</i> potencia el fenotipo de ojo inducido por la expresión de (CUG)₄₈₀.....	64
Figura 36. La sobre-expresión del gen <i>smaug (smg)</i> suprime el fenotipo de ojo inducido por la expresión de (CUG)₄₈₀ mientras que la falta de función lo potencia	65

Figura 37. La falta de función del gen <i>yantar</i> (<i>ytr</i>) potencia el fenotipo de ojo inducido por la expresión de (CUG)₄₈₀.....	66
Figura 38. Alteraciones en los niveles del gen <i>poly A binding protein</i> (<i>pAbp</i>) potencian el fenotipo de ojo inducido por la expresión de (CUG)₄₈₀.....	67
Figura 39. La falta de función de <i>skuld</i> suprime el fenotipo inducido por (CUG)₄₈₀.....	71
Figura 40. Las deficiencias <i>Df(3R)Exel6178</i> y <i>Df(1)Exel6221</i> suprimen el fenotipo de ojo de nuestro modelo de DM1	72
Figura 41. Área delecionada en la deficiencia <i>Df(1)Exel6221</i>.....	73
Figura 42. Área delecionada en la deficiencia <i>Df(3R)Exel6178</i>.....	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización de los individuos con DM1	4
Tabla 2. Genes que sufren fallos en el <i>splicing</i> alternativo en pacientes con DM1 ...	14
Tabla 3. Resumen de líneas transgénicas obtenidas	26
Tabla 4. Lista de genes en los que se analizaron posibles fallos en <i>splicing</i> alternativo tras la expresión de (CUG) ₄₈₀	47
Tabla 5. Lista de genes utilizados en el <i>screen</i> de proteínas de unión de ARN	54
Tabla 6. Genes que codifican para proteínas de unión a ARN capaces de modificar el fenotipo inducido por (CTG) ₄₈₀	56
Tabla 7. Diagrama de los resultados obtenidos en el <i>screen</i> realizado con elementos P	69
Tabla 8. Lista de genes cuya falta de función potencia el fenotipo inducido por la expresión de CUGs expandidos descubiertos en el <i>screen</i> con elementos P	69
Tabla 9. Tabla de los alelos disponibles para el gen <i>skuld</i>	70
Tabla 10. Diagrama de los resultados obtenidos en el <i>screen</i> realizado con la colección de deficiencias	72

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
APP	Proteína precursora del β amiloide. Del inglés “ β amyloid precursor protein”
<i>Appl</i>	Gen de la proteína parecida a la proteína precursora del β amiloide de <i>Drosophila</i> . Del inglés “ β amyloid protein precursor-like”
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Trifosfato de adenosina
<i>Atx2</i>	Gen de la proteína Ataxina 2
<i>bcd</i>	Gen de la proteína Bicoid de <i>Drosophila</i>
<i>BicD</i>	Gen de la proteína Bicaudal D de <i>Drosophila</i>
<i>bl</i>	Gen de la proteína Bancal de <i>Drosophila</i>
<i>bol</i>	Gen de la proteína Boule de <i>Drosophila</i>
BSA	Albúmina de suero bovino
<i>Ca-P60A</i>	Gen de la ATPasa del Calcio en la posición 60A de <i>Drosophila</i> . Del inglés “Calcium ATPase at 60A”
dCBP	Proteína de unión a Creb de <i>Drosophila</i> , factor de transcripción nuclear. Del inglés “CREB binding protein”
CELF	Familia de proteínas a la que pertenecen CUG-BP y factores parecidos a ETR-3. Del inglés “CUG-BP and ETR-3-like factors”
CIC-1	Canal de Cloro 1
<i>CLCN-1</i>	Gen del Canal de Cloro 1
cTNT	Troponina cardiaca T
CUG-BP	Proteína de unión a CUGs. Del inglés “CUG-binding protein”
<i>DAZ</i>	Gen “Deleted in Azoospermia”
<i>Dlc</i>	Gen de la proteína de la cadena ligera de Dineina de <i>Drosophila</i> . Del inglés “Dinein light chain”
DM1	Distrofia Miotónica Tipo 1
DM2	Distrofia Miotónica Tipo 2
DM300	Modelo de ratón que contiene 300 repeticiones de CTG en el contexto del gen <i>DMPK</i> y sus genes adyacentes

DMPK	Kinasa de la distrofia miotónica. Del inglés “Dystrophia myotonica protein kinase”
<i>DMWD</i>	Gen de la proteína DM con repeticiones DW
<i>Egl</i>	Gen de la proteína Egalitarian de <i>Drosophila</i>
eIF-3	Factor de iniciación de la traducción de eucariotas 3. Del inglés “Eukariotic initiation factor”
<i>elav</i>	Gen de la proteína Elav de <i>Drosophila</i> . Del inglés “Embrionic lethat abnormal vision”
EMS	Etilmetilsulfonato
EP	Elemento P potenciador. Del inglés “Enhancer P element”
ETR-3	Proteína de unión a ARN tipo Elav. Del inglés “Elav type RNA-binding protein”
FDF	Falta de función
<i>FGCRT</i>	Gen del fragmento Fc receptor y transportador de la inmunoglobulina G
GAL4	Proteína del factor de transcripción de levaduras GAL4
GMR	Proteína “Glass multiper reporter” de <i>Drosophila</i>
hnRNP	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear
HSA ^{LR}	Modelo de ratón que contiene repeticiones largas (LR=“long repeats”) de CTGs bajo el control del promotor del gen de la alpha Actina del músculo esquelético humana. Del inglés “Human skeletal alpha actin”
<i>InR</i>	Gen del Receptor de la Insulina de <i>Drosophila</i>
<i>Int6</i>	Gen homólogo de Int6 de <i>Drosophila</i>
IR	Receptor de la Insulina
kDa	Kilo Daltons
KH	Motivos de unión a ARN de tipo KH. Del inglés “K homology”
Mbl	Proteína Muscleblind
MBNL	Proteínas parecidas a Muscleblind. Del inglés “Muscleblind-like”
<i>Mbnl1</i>	Gen de la proteína Muscleblind 1 de <i>Mus Musculus</i>
MEB	Microscopio electrónico de barrido
MEF2A	Factor potenciador de miocitos 2A. Del inglés “Myocyte enhancer factor 2A”
met-tARN	ARN de transferencia de metionina

MHC	Proteína de la cadena pesada de Miosina. Del ingles “Myosin heavy chain”
MTMR1	Proteína relacionada con la Miotubularina 1
MVI	Músculos de vuelo indirecto
NMDA	N-metil d-aspartato
NMDAR1	Receptor de NMDA 1
<i>Nmadr1</i>	Gen del Receptor de NMDA 1 de <i>Drosophila</i>
<i>nos</i>	Gen de la proteína Nanos de <i>Drosophila</i>
<i>osk</i>	Gen de la proteína Oskar de <i>Drosophila</i>
<i>pAbp</i>	Gen de la proteína de unión a poli-A de <i>Drosophila</i>
PABP	Proteína de union a poli-A
PBS	Solución salina tamponada con fosfato. Del inglés “Phosphate-buffered saline”
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa. Del inglés “Polimerase chain reaction”
PDM	Distrofia miotónica proximal
PROMM	Miopatía miotónica proximal
<i>qkr58E-3</i>	Gen de la proteína relacionada con quaking en la posición 58E-3 de <i>Drosophila</i>
RRM	Dominios de reconocimiento de ARN. Del inglés “RNA recognition motifs”
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa de los productos de transcripción inversa. Del inglés “Reverse transcriptase PCR”
<i>Rya-r44F</i>	Gen del Receptor de Rianodina en la posición 44 F de <i>Drosophila</i>
RyR	Receptor de Rianodina
R γ	Rayos gamma
SE	Sobre-expresión
SERCA	Proteína de la Bomba de Ca ²⁺ dependiente de ATP del retículo sarcoplasmático/endoplasmático
<i>SIX5</i>	Gen de humanos de la proteína SIX5, homólogo del gen homeótico <i>sine oculis</i> de <i>Drosophila</i>
<i>skd</i>	Gen de la proteína Skuld de <i>Drosophila</i>

SM5	Cromosoma 2 balanceado SM5. Del inglés “Second multiply inverted”
<i>Smg</i>	Gen de la proteína Smaug de <i>Drosophila</i>
SSC	Solución salina tamponada con citrato
TM2	Cromosoma 3 balanceado TM2. Del inglés “Third multiply inverted”
TM6B	Cromosoma 3 balanceado TM6B. Del inglés “Third multiply inverted”
<i>TNNT2</i>	Gen de la Troponina cardiaca T
<i>TNNT3</i>	Gen de la Troponina T esquelética rápida
TRAP	Proteína asociada con el receptor de la hormona tiroidea. Del inglés “Thyroid-hormone-receptor-associated protein”
UAS	Secuencias reguladoras, sitios de unión de la proteína GAL4. Del inglés “upstream activation sequence”
<i>up</i>	Gen de la proteína Upheld o Troponina T de <i>Drosophila</i>
XLMTM	Miopatía muscular ligada al cromosoma X
<i>ytr</i>	Gen de la proteína Yantar de <i>Drosophila</i>
ZASP	Proteína con dominio PDZ de las bandas Z que sufre <i>splicing</i>
alternativo	
ZNF9	Proteína con dominios zinc finger 9
μm	Micras

1. RESUMEN

La Distrofia Miotónica de tipo 1 (DM1) es una enfermedad neuromuscular causada por la expansión de un triplete CTG en la región 3' no traducida del gen *dystrophia myotonica protein kinase* (*DMPK*). Existen hipótesis que proponen que la patogenicidad en la DM1 se debe a una ganancia de función tóxica del ARN expandido de *DMPK*. Este ARN expandido queda retenido en el núcleo de las células musculares en pacientes, donde secuestra e induce cambios en los niveles de las proteínas de unión a ARN MBNL1 y CUG-BP1. La idea de este trabajo es estudiar el papel que juegan las proteínas de unión a ARN en la toxicidad inducida por el triplete CUG expandido, mediante la generación de un modelo transgénico en *Drosophila* que expresa un ARN no traducido, con 480 repeticiones de CUG. Observamos que este transcrito (CUG)₄₈₀ se acumula en fosas nucleares y su expresión tiene efecto tóxico tanto en el ojo como en el músculo, donde se observa degeneración y pérdida de masa muscular en *Drosophila*. Por otro lado, el modelo de DM1 presentado en este estudio reproduce también fallos en el *splicing* alternativo (ajuste alternativo o corte y empalme) de al menos uno de los genes descritos en pacientes con DM1. Si alteramos los niveles de las proteínas de unión a ARN MBNL1 y CUG-BP1, observamos una modificación de los fenotipos degenerativos inducidos por (CUG)₄₈₀. La toxicidad del triplete CUG expandido es suprimida cuando aumentamos los niveles de MBNL1. Además, la expresión de (CUG)₄₈₀ causa un descenso en los niveles de MBNL1 soluble, ya que queda secuestrado en las fosas nucleares que forman los (CUG)₄₈₀. Por el contrario, cuando aumentamos los niveles de CUG-BP1 potenciamos el fenotipo de (CUG)₄₈₀. Estos datos apoyan un mecanismo en el cual niveles bajos de MBNL1 y niveles altos de CUG-BP1 median la toxicidad inducida por ARN que se observa en la DM1. Quizás más importante aún, nuestros datos demuestran que la toxicidad inducida por los CUGs expandidos en el músculo puede ser suprimida. Además, utilizando el fenotipo de ojo, hemos llevado a cabo 2 *screens* genéticos para identificar nuevos modificadores. El primero es un *screen* dirigido con proteínas de unión a ARN y el segundo un *screen* al azar con dos colecciones de mutaciones por falta de función. Los resultados obtenidos de los *screens* prueban que nuestro modelo de DM1 en *Drosophila* es una potente herramienta en el estudio de la enfermedad. Los datos aquí descritos constituyen una prueba contundente de la toxicidad del triplete CUG expandido *in vivo*. Nuestro modelo en *Drosophila* reproduce eventos clave de la patología de la DM1, y además es la primera vez que se muestra *in vivo* la supresión

de la degeneración en un modelo de DM1 por MBNL1 y del empeoramiento con CUG-BP1. Hemos identificado nuevas proteínas implicadas en el procesamiento del ARN que podrían tener un papel en la patología de DM1 y hemos encontrado modificadores genéticos de la toxicidad inducida por (CUG)₄₈₀ en otras rutas. Estos datos aumentan el conocimiento sobre esta enfermedad y proporcionan nuevos genes candidatos como dianas terapéuticas para su tratamiento.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Descripción y genética de la Distrofia Miotónica Tipo 1

La distrofia miotónica de tipo 1 (DM1) es la forma más común de distrofia muscular en adultos con una incidencia de 1 afectado por cada 8000 nacimientos. Se trata de una enfermedad con herencia autosómica dominante que se caracteriza por la degeneración neuromuscular y que afecta a varios sistemas. Las manifestaciones clínicas principales de la DM1 son la miotonía (incapacidad de relajar voluntariamente el músculo una vez contraído) y la distrofia (degeneración lenta y progresiva de los músculos esqueléticos caracterizada por debilidad y deterioro de estos). A pesar de ser la miotonía y la distrofia los síntomas más característicos de la enfermedad, la DM1 viene acompañada de defectos en la conducción cardíaca, problemas de respiración y de deglución, atrofia testicular, cataratas, resistencia a la Insulina y somnolencia. A nivel histológico, las biopsias de músculos de pacientes con DM1 presentan núcleos centrales, variabilidad en el tamaño de las fibras musculares y mayoría de fibras de tipo I así como masas sarcoméricas. Todos estos fenotipos son indicativos de degeneración muscular (Harper, Brook et al. 2001).

La mutación responsable de la DM1, descrita en 1992, consiste en una expansión de un triplete de CTGs repetido en la región 3' no traducida del gen *DMPK* (*dystrophia myotonica protein kinase*) en el cromosoma 19q13.3. La DM1 fue la primera enfermedad de herencia dominante descubierta que es causada por una expansión de repeticiones no traducidas, ya que la mutación se transcribe a ARN pero no se traduce a proteína.

El número de repeticiones del triplete en individuos no afectados por la enfermedad es de hasta 30 CTGs. En individuos afectados el número de repeticiones va desde 50 hasta miles de repeticiones. La edad de aparición de los síntomas es inversamente proporcional al número de repeticiones, mientras que la gravedad de estos es directamente proporcional. Las personas que desarrollan la enfermedad en edad adulta tienen menos de 100 repeticiones, los casos en los que la enfermedad ocurre en la juventud tienen hasta 500 repeticiones y los casos más graves son los congénitos, donde los enfermos tienen alrededor de 1000 repeticiones. El grado de

expansión de la mutación aumenta en cada generación mediante el fenómeno molecular de anticipación genética.

Fenotipo	Síntomas clínicos	Tamaño repetición CTG	Edad de aparición síntomas (Años)	Expectativa de vida (Años)
Pre-mutación	Ninguno	38 a ~49	Normal	Normal
Medio	Leve miotonía Cataratas Hiperinsulinismo	50 a ~150	20-70	60-normal
Clásico	Debilidad Miotonía Ptosis Cataratas Calvicie frontal Arritmia cardíaca Apnea del sueño Caída del pie Embarazos complicados Oftalmoplegia Músculo liso: disfagia, estreñimiento, diarrea Deficiencia cognitiva	~100 a ~1000	10-30	48-50
Congénito	Hipotonía infantil Complicaciones respiratorias Retraso mental Pie zambo	~1000 a >2000	0-10	45

Tabla 1. Caracterización de los individuos con DM1.

2.2. Distrofia Miotónica Tipo 2

Existe un segundo tipo de distrofia miotónica, DM2, descrita por primera vez en 1994 y que no presenta expansión del triplete de CTGs (Thornton, Griggs et al. 1994). Para describir esta enfermedad también se han utilizado los nombres distrofia miotónica proximal (PDM) (Udd, Krahe et al. 1997) y miopatía miotónica proximal (PROMM) (Ricker, Koch et al. 1994; Ricker, Koch et al. 1995; Meola, Sansone et al. 1996). En 1998 el locus de la DM2 se asignó al cromosoma 3q (Ranum, Rasmussen et al. 1998) y en el 2001 se descubrió que la DM2 es causada por una expansión de CCTG repetidos en el primer intrón del gen *ZNF9* (*zinc finger protein 9*) (Liquori, Ricker et al. 2001).

Muchas de las características clínicas de las dos DMs son comunes: miotonía, distrofia muscular, cataratas, arritmias cardíacas, resistencia a la Insulina y diabetes, hipogammaglobulinemia y atrofia testicular. Las diferencias clínicas entre la DM1 y la DM2 tienen que ver principalmente con la miotonía y la severidad de los demás síntomas; en la DM1 la miotonía se inicia en la parte distal de las extremidades, mientras que en la DM2 se inicia en la parte proximal y los síntomas son menos severos que en la DM1.

2.3. Modelos de patogénesis

En los últimos años se han propuesto tres modelos diferentes para explicar como la expansión de un triplete en la región no traducida de un gen podía causar una enfermedad que afecta a tantos tejidos diferentes. Estos modelos se conocen como: modelo de haploinsuficiencia de DMPK, modelo de alteración en los niveles de expresión de los genes vecinos y modelo de ganancia de función del ARN.

2.3.1. Modelo de haploinsuficiencia de DMPK

El modelo de haploinsuficiencia de DMPK propone que la expansión del triplete afecta los niveles de expresión de DMPK en *cis* ya sea mediante alteraciones en su transcripción o porque hace que los transcritos de *DMPK* queden retenidos en el núcleo celular y no puedan ser transportados al citoplasma. Esto daría como resultado un descenso en la cantidad de proteína DMPK o haploinsuficiencia. Con objeto de probar esta teoría se generaron modelos de ratón que tenían un *knockout* para la proteína homóloga a DMPK en ratones (Jansen, Groenen et al. 1996; Reddy, Smith et al. 1996; Berul, Maguire et al. 1999). Los modelos de ratón carentes de DMPK funcional solo presentan defectos en la conducción cardíaca parecidos a los que sufren los pacientes con DM1 y una leve miopatía, pero ninguno de los otros síntomas de la enfermedad. Por otro lado, no ha sido descrita ninguna mutación puntual en el gen *DMPK* que se haya podido asociar a los fenotipos de la DM1, por lo que queda probado que los defectos observados en esta enfermedad no son solo debidos a haploinsuficiencia de DMPK.

2.3.2. Modelo de alteración en los niveles de expresión de genes vecinos

El segundo modelo que se propuso como causa de la DM1 postulaba que la mutación expandida altera la estructura de la cromatina y afecta los niveles de

expresión de genes vecinos en la región de DM1. Estos genes son *SIX5*, *DMWD* y *FGCRT*. El gen homeótico *SIX5* es homólogo del también gen homeótico *sine oculis 5* de *Drosophila*. *DMWD* es el gen de DM con repeticiones WD (Frisch, Singleton et al. 2001) y se expresa mayoritariamente en los testículos y el cerebro (Westerlaken, Van der Zee et al. 2003) (Figura 1). Por último, *FGCRT* es el gen que codifica para el fragmento Fc receptor y transportador de la inmunoglobulina G y se encuentra a 4Mb de la expansión de CTGs (Junghans, Ebrilidze et al. 2001). Los modelos de ratón con *knockout* de *Six5* desarrollan cataratas pero no presentan ninguno de los otros síntomas de la DM1 (Klesert, Cho et al. 2000; Sarkar, Appukuttan et al. 2000).

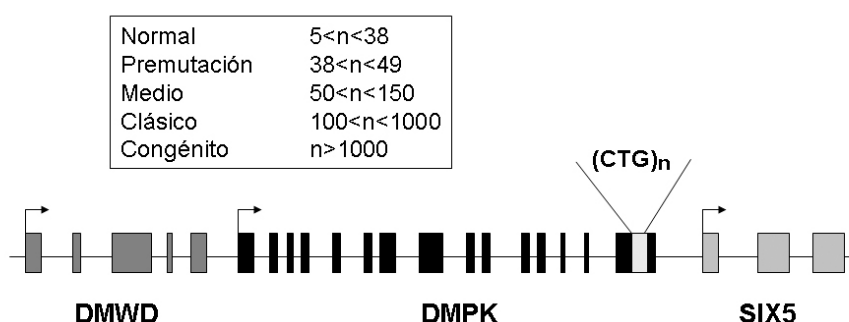


Figura 1. Región del cromosoma 19q. Locus de la DM1, el gen *DMPK* con el triplete de CTGs repetidos y sus genes adyacentes *DMWD* y *SIX5*. En el recuadro queda detallada la clasificación de la mutación dependiendo del número de repeticiones.

2.3.3. Modelo de ganancia de función del ARN

Una vez demostrado que los niveles de *DMPK* y los genes adyacentes no eran responsables de la mayoría de las características clínicas y patológicas en la DM1, se propuso un modelo en el cual el triplete CTG expandido actuaría en *trans*, al nivel del ARN. El modelo de ganancia de función del ARN propone que los transcritos mutantes con CUGs que se acumulan en fosas intranucleares (como se ve en células de pacientes con DM1) tienen un efecto tóxico sobre el metabolismo celular.

De acuerdo con este modelo los ARNs con CUGs expandidos causan un secuestro de proteínas de unión a ARN implicadas en el procesamiento y maduración de diferentes genes. Este secuestro previene la unión de estas proteínas con sus transcritos diana y estos ven alterada su expresión. ARNs con menos de diez repeticiones de CUG son mayoritariamente de cadena sencilla, mientras que por encima de veinte CUGs se pliegan espontáneamente y forman una horquilla de doble

cadena (Napierala and Krzyzosiak 1997). Mediante microscopía electrónica se visualizaron ARNs con 90 y 130 repeticiones plegados en forma de horquilla de doble cadena (Michalowski, Miller et al. 1999). Por otro lado, estas expansiones de ARN se acumulan en fosas nucleares que se pueden visualizar mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH) con oligonucleótidos (CUG)_n (Taneja, McCurrach et al. 1995; Davis, McCurrach et al. 1997; Amack, Paguio et al. 1999).

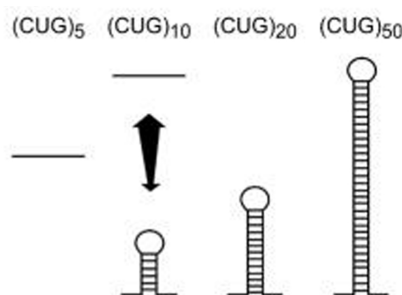


Figura 2. Las expansiones con más de 20 repeticiones de CUG forman horquillas de ARN bicatenarias. Los ARN expandidos con más de 20 repeticiones de CUG tienden a formar espontáneamente horquillas bicatenarias de ARN, mientras que los de menos de 10 repeticiones son mayoritariamente monocatenarios (Imagen tomada de (Miller, Urbinati et al. 2000)).

Tanto la expansión de CTGs en la DM1 como la de CCTGs en la DM2 son transcritas a ARN pero no afectan la parte que codifica a proteína de ninguno de los genes. Por otro lado, no solo la función normal de la proteína ZNF9 en la DM2 (como proteína de unión a ácidos nucleicos) no tiene relación con ninguna de las proteínas de la región de DM1; sino que el resto de genes en la región de DM2 (*KIAA1160*, *Rab11B*, *glycoprotein IX*, *FLF11631*) tampoco tienen relación con los de el locus de DM1 (*DMPK*, *SIX5*, *DMWD*, *FCGRT*) (Day and Ranum 2005). Por lo tanto, parece que lo único que tienen en común las dos enfermedades es una expansión de repeticiones a nivel del ARN, lo cual dio más fuerza al modelo de ganancia de función del ARN.

Existen evidencias directas que con el tiempo han ido apoyando la hipótesis de que la patología en la DM1 es causada por una ganancia de función del ARN con repeticiones expandidas. En primer lugar, CTGs expandidos en la región 3' del ARNm de *DMPK* son suficientes para inhibir la diferenciación de mioblastos en cultivos celulares C2C12 de ratón (Amack, Paguio et al. 1999). En segundo lugar, existen dos modelos de ratón (*HSA*^{LR} y DM300) que expresan los ARNs expandidos

en músculo esquelético que presentan fallos en el *splicing* y tienen miotonía y distrofia muscular (Mankodi, Logigian et al. 2000; Seznec, Agbulut et al. 2001). Los ratones HSA^{LR} contienen una expansión de CTGs insertada en la región 3' del gen humano de la alpha actina de músculo esquelético (HSA: human skeletal alpha actin) y los ratones DM300 expresan un fragmento genómico más largo en el contexto de *DMPK* con 300 repeticiones de CTG y los genes adyacentes. En tercer lugar los transcritos que tienen expandidas las repeticiones de CTGs o de CCTGs se acumulan en fosas nucleares de ARN (Taneja, McCurrach et al. 1995; Liquori, Ricker et al. 2001; Mankodi, Urbinati et al. 2001; Fardaei, Rogers et al. 2002). Por último estos transcritos alteran la regulación y la localización de proteínas de unión a ARN como tres isoformas de Muscleblind (MBNL1, MBNL2 y MBNL3) (Miller, Urbinati et al. 2000; Fardaei, Larkin et al. 2001; Mankodi, Urbinati et al. 2001; Fardaei, Rogers et al. 2002) y CUG-BP (Timchenko, Timchenko et al. 1996). Los cambios en la actividad de estas proteínas de unión a ARN tienen como consecuencia alteraciones en el *splicing* alternativo y en la función normal de distintos genes implicados en la patología de la DM1. Hasta la fecha se han descrito fallos en el *splicing* de los genes que codifican para la Troponina cardíaca T (Philips, Timchenko et al. 1998), el Receptor de la Insulina (Savkur, Philips et al. 2001), el Canal de Cloro 1 (Charlet, Savkur et al. 2002), la Miotubularina (Buj-Bello, Furling et al. 2002), el Receptor de Rianodina, la Bomba de Ca^{2+} dependiente de ATP del retículo sarcoplásmico/endoplásmico 1 (Kimura, Nakamori et al. 2005), el Receptor de NMDA 1, la proteína precursora del β amiloide (Jiang, Mankodi et al. 2004) y la proteína asociada a microtúbulos Tau (Sergeant, Sablonniere et al. 2001; Jiang, Mankodi et al. 2004; Leroy, Wang et al. 2006).

2.4. Defectos en el *splicing* alternativo en la DM1

El *splicing* alternativo del ARN es el mecanismo mediante el cual el ARN mensajero primario de un gen es editado para producir varios ARN mensajeros (ARNm) que contienen solo secuencias codificantes. Este proceso ocurre en el núcleo, donde se cortan las secuencias intrónicas de los ARN heteronucleares largos (ARNhn) hasta obtener una molécula de ARNm más pequeña que es exportada al citoplasma para ser traducida. Hasta un 74% de los genes humanos expresan varios ARNm mediante *splicing* alternativo (Johnson, Castle et al. 2003). Las diferencias en

las funciones de las distintas isoformas generadas por *splicing* alternativo pueden tener un gran impacto sobre la fisiología de la célula. Por otro lado, hasta un 30% de los acontecimientos de *splicing* alternativo dan como resultado codones de terminación prematuros en el ARNm que hacen que este sea eliminado por la maquinaria de degradación celular (Lewis, Green et al. 2003). Por tanto, este tipo de *splicing* no solo controla la producción de distintas isoformas sino también sus niveles. El *splicing* alternativo está regulado en relación con el tipo de célula, el estado de desarrollo o como respuesta a estímulos externos. En esta regulación participan proteínas de unión a ARN, que se unen a sitios específicos dentro del ARNm.

2.4.1. Troponina cardiaca T

En 1998 se descubrió que las alteraciones en el *splicing* alternativo de la Troponina cardiaca T (cTNT) en la DM1 eran debidas a un aumento de la actividad de la proteína de unión a CUGs (CUG-BP) causado por la expansión de CUGs en el ARN (Philips, Timchenko et al. 1998). CUG-BP se une a secuencias intrónicas con CUGs que sirven como señales de *splicing* en el pre-ARNm de *cTNT*. Debido a esto, en el músculo cardíaco y esquelético de pacientes adultos con DM1 se detectan transcritos que incluyen el exon 5, isoforma que generalmente solo se detecta en tejidos fetales. Esta fue la primera vez que se demostró que alteraciones en el *splicing* de un gen se debían a efectos dominantes en *trans* de un ARN mutante. Es posible que el aumento de expresión de la forma fetal de cTNT contribuya a los defectos en la función del miocardio y en la conducción cardíaca observados en pacientes con DM1 (Phillips and Harper 1997).

2.4.2. Receptor de la Insulina

La resistencia a la Insulina es una anomalía metabólica común en los pacientes con DM1. El mecanismo de esta resistencia no se conoce, pero existen evidencias que apuntan a alteraciones relacionadas con el Receptor de la Insulina (Violettes, Pouget et al. 1986). El Receptor de la Insulina (IR) está compuesto por dos subunidades α y dos β . La Insulina se une a las subunidades α extracelulares y esto da como resultado la autofosforilación de las subunidades β intracelulares. El *splicing* alternativo del exón 11 de la subunidad α da como resultado la expresión de dos isoformas: IR-A (no

incluye el exón 11) e IR-B (incluye el exón 11). La expresión de cada una de las isoformas es específica de tejido (Seino and Bell 1989). La isoforma B se expresa predominantemente en tejidos que responden a la Insulina responsables de la homeostasis de la glucosa como el tejido adiposo, el hígado y el músculo esquelético. En el músculo esquelético de pacientes con DM1 en cambio lo que se encuentra es un aumento de la expresión de la isoforma A como consecuencia de una alteración en el *splicing* alternativo. Esta pérdida en el patrón de *splicing* específico del músculo se relaciona con una respuesta reducida a los efectos metabólicos de la Insulina. Este cambio en el *splicing* también se puede inducir aumentando los niveles de CUG-BP. Al darse un aumento de la actividad de CUG-BP en los tejidos con DM1 es muy probable que sea esta proteína la responsable del cambio en el *splicing* del IR que se observa en el músculo esquelético con DM1 (Savkur, Philips et al. 2001). Estos datos, junto con el hecho de que también ha sido descrito un descenso en los niveles de expresión del IR en el músculo esquelético con DM1 (Morrone, Pegoraro et al. 1997), parecen explicar la resistencia a la Insulina que se da en pacientes con DM1.

2.4.3. Canal de Cloro

La miotonía, uno de los síntomas característicos de la DM1, se manifiesta como un retraso en la relajación del músculo esquelético tras una contracción voluntaria (Harper, Brook et al. 2001). Esta miotonía se produce por hiperexcitabilidad de las fibras musculares, lo cual produce potenciales de acción repetitivos que hacen que se mantenga la contracción involuntariamente (Lehmann-Horn and Jurkat-Rott 1999). Tanto en humanos como en modelos de ratón la falta de función específica del Canal de Cloro 1 (CIC-1) en el músculo puede causar miotonía. En el músculo esquelético de pacientes con DM1 los niveles de la proteína CIC-1 están reducidos (Charlet, Savkur et al. 2002). Se ha demostrado que la falta de proteína CIC-1 en la membrana del músculo esquelético es suficiente para causar miotonía en la DM1 (Charlet, Savkur et al. 2002). En el músculo esquelético con DM1 se produce un fallo en el *splicing* alternativo del ARNm del *CIC-1* que tiene como consecuencia que la mayoría de los transcritos que se encuentran contienen codones de terminación prematuros por la retención del intrón 2 o por la inclusión de los exones 6b y 7a (Charlet, Savkur et al. 2002). Un patrón de *splicing* alternativo similar para el *CIC-1* ha sido descrito en el modelo de ratón que expresa una expansión del triplete de CTGs en el músculo esquelético bajo el control del promotor

de la Actina (HSA^{LR}) (Mankodi, Takahashi et al. 2002). Por otro lado también ha sido demostrado que la sobre-expresión de CUG-BP en células normales induce la retención del intrón 2 mediante la unión a motivos ricos en U/C que contiene el pre-ARNm del *CIC-1* (Charlet, Savkur et al. 2002).

2.4.4. Proteína relacionada con la Miotubularina 1

El gen de la proteína relacionada con la Miotubularina 1 (*MTMR1*), pertenece a una gran familia de fosfatasa conservada de levaduras a humanos (Laporte, Blondeau et al. 2001). El gen de la Miotubularina da nombre a esta familia, *MTMI*; y está mutado en la miopatía muscular ligada al cromosoma X (XLMTM). Se trata de un desorden muscular congénito que se caracteriza por una fuerte hipotonía y debilidad muscular. La enfermedad la padecen niños que normalmente mueren durante el primer año de vida por problemas derivados del arresto del desarrollo muscular (Laporte, Hu et al. 1996). En la forma congénita de DM1, se da un cambio en el *splicing* alternativo del ARNm de MTMR1. En cultivos de miocitos, cuando se induce la diferenciación a miotúbulos se produce un cambio de la isoforma A fetal a la C (que incluye los exones 2.1 y 2.2) de adulto. En cultivos celulares derivados de pacientes con DM1 congénita se ve una disminución de la isoforma C y la aparición de una isoforma nueva llamada G (que solo incluye el exón 2.2). La misma isoforma G se obtiene en muestras de músculo de fetos con DM1 congénita pero no en fetos control (Buj-Bello, Furling et al. 2002). Este cambio en el *splicing* alternativo de MTMR1 parece jugar un papel importante en el fenotipo que se da en pacientes con DM1 congénita.

2.4.5. Receptor de Rianodina 1 y Bomba de Ca^{2+} dependiente de ATP del retículo sarcoplásmico/endoplásmico 1

Los últimos genes descritos hasta la fecha que sufren fallos en el *splicing* alternativo son los de el Receptor de Rianodina 1 (*RyR1*) y de la bomba de Ca^{2+} dependiente de ATP del retículo sarcoplásmico/endoplásmico 1 (*SERCA1*, *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase*) (Kimura, Nakamori et al. 2005). La regulación de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en el músculo esquelético depende principalmente de estas dos proteínas del retículo sarcoplásmico. El RyR1 libera Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico como respuesta a la despolarización por interacción mecánica con los canales de calcio dependientes de voltaje. SERCA

transporta el Ca^{2+} a través de la membrana del retículo sarcoplasmático/endoplasmático asociado a la hidrólisis de ATP (Kimura, Nakamori et al. 2005). Como consecuencia de esta actividad, la concentración de Ca^{2+} libre citosólico en reposo se mantiene más baja que dentro del retículo sarcoplasmático/endoplasmático. Durante un ciclo normal de relajación/contracción en el músculo esquelético el Ca^{2+} sale del retículo sarcoplásmico hacia el citoplasma a través del RyR1, lo cual induce la contracción muscular. A continuación el Ca^{2+} se bombea de vuelta hacia el lumen del retículo sarcoplasmático mediante SERCA para permitir la relajación (Kimura, Nakamori et al. 2005). En cultivos de células musculares con DM1 se han detectado altas concentraciones de Ca^{2+} y se sugirió que podía contribuir a causar la degeneración muscular que se ve en los pacientes (Jacobs, Benders et al. 1990). Tanto *RyR* como *SERCA* sufren *splicing* alternativo regulado específicamente en el desarrollo y en los distintos tejidos. Es por esto que los fallos en el *splicing* alternativo de *RyR1* y *SERCA1* podrían ser importantes para dilucidar el mecanismo de degeneración muscular en DM1.

En mamíferos existen tres genes que codifican para Receptores de Rianodina: *RyR1*, *RyR2* y *RyR3*. Existen varias isoformas generadas por *splicing* alternativo del *RyR1* en humanos. Se estudió la inclusión o exclusión del exón 70 denominado ASI, La isoforma ASI(+), que incluye el exón 70, se expresa mayoritariamente en músculos adultos desarrollados normalmente, y la isoforma ASI(-) se encuentra predominantemente en miotúbulos. Por el contrario, en pacientes con DM1 se observa un aumento de la isoforma ASI(-) en el músculo adulto. El mismo cambio en el *splicing* alternativo del *RyR1* se detectó en el modelo de DM1 en ratón HSA^{LR} (Kimura, Nakamori et al. 2005).

En mamíferos existen 3 genes que codifican para las SERCAs: SERCA 1, SERCA 2 y SERCA 3. Existen dos isoformas mayoritarias de SERCA1 producidas por *splicing* alternativo del exón 22 que afecta a siete amino ácidos del extremo C-terminal. La isoforma SERCA1a (+exón 22) es la forma adulta en músculos normales, mientras que la isoforma SERCA1b (-exón 22) es la forma fetal. En músculo de pacientes con DM1 se encuentra casi exclusivamente SERCA1b. Incluso en miotúbulos la cantidad de SERCA1b es mayor en muestras con DM1 que en controles sanos. La misma abundancia de SERCA1b en músculo adulto y en

miotúbulos se encuentra en ratones HSA^{LR} (Kimura, Nakamori et al. 2005). Durante el estudio del *splicing* alternativo de SERCA1, se estudió también el de SERCA2, que en lugar de estar controlado durante el desarrollo es controlado por tipo de tejido. El análisis del *splicing* de las isoformas de SERCA2 en músculo esquelético de pacientes con DM1 o ratones HSA^{LR} no reveló ninguna anomalía significativa, aunque sí se detectó una nueva isoforma en músculos de pacientes con DM1 (Kimura, Nakamori et al. 2005).

El fallo en el control del *splicing* alternativo específico de desarrollo que se da en DM1 para RyR1 y SERCA1 podría contribuir fallos en la homeostasis del Ca²⁺ y la degeneración muscular en la DM1 (Kimura, Nakamori et al. 2005).

2.4.6. Receptor de NMDA 1, proteína precursora del β amiloide y Tau

Los genes arriba descritos se expresan mayoritariamente en tejido muscular. En la DM1 también se han descrito anormalidades en el *splicing* de genes que probablemente contribuyan a los defectos en los que está implicado el sistema nervioso. Estos son la hipersomnolencia, fallos en el conocimiento, alta sensibilidad a agentes anestésicos, hipoventilación central, fallos neuroendocrinos y alteraciones de la conducta y la personalidad (Harper, Brook et al. 2001). Aunque todavía existe mucho desconocimiento sobre el mecanismo y la neuropatología en el sistema nervioso de pacientes con DM1, se han hecho algunos avances al describir fallos en el *splicing* alternativo de genes expresados en tejido nervioso como el receptor del NMDA 1 (NMDAR1), la proteína precursora del β amiloide (APP) (Jiang, Mankodi et al. 2004) y la proteína asociada a microtúbulos Tau (MAPT) (Sergeant, Sablonniere et al. 2001; Jiang, Mankodi et al. 2004; Leroy, Wang et al. 2006).

En estudios con muestras cerebrales de pacientes con DM1 se han encontrado fallos en el *splicing* alternativo del NMDAR1, donde se observa un aumento de inclusión del exón 5 (Jiang, Mankodi et al. 2004); el APP, donde se detectó un descenso o exclusión del exón 7 (Jiang, Mankodi et al. 2004); y Tau, donde se da exclusión de los exones 2 y 10 (Sergeant, Sablonniere et al. 2001; Jiang, Mankodi et al. 2004) y exclusión del exón 6c con inclusión del exón 6d (Leroy, Wang et al. 2006). El NMDAR1 es importante para el aprendizaje y la memoria a largo plazo

(Tonegawa, Tsien et al. 1996; Tsien, Huerta et al. 1996), por lo que es posible que los fallos en el *splicing* del NMDAR1 contribuyan a causar problemas con la memoria que se dan en la DM1 (Portwood, Wicks et al. 1986; Rubinsztein, Rubinsztein et al. 1997).

Gen	Tejido	Referencia
Troponina cardíaca T (<i>TNNT2</i>)	Corazón	Philips et al. 1998
Receptor de la Insulina (<i>IR</i>)	Músculo esquelético	Savkur et al. 2001
Canal de Cloro (<i>CLCN-1</i>)	Músculo esquelético	Charlet et al. 2002, Mankodi et al. 2002
Tau (<i>MAPT</i>)	Cerebro	Jiang et al. 2004, Sergeant et al. 2001
Proteína relacionada con la Miotubularina 1 (<i>MTMR1</i>)	Músculo esquelético/corazón	Buj-Bello et al. 2002, Ho et al. 2005
Troponina T esquelética rápida (<i>TNNT3</i>)	Músculo esquelético	Kanadia et al. 2003
Proteína precursora del β amiloide (<i>APP</i>)	Cerebro	Jiang et al. 2004
Receptor de NMDA 1 (<i>NMDAR1</i>)	Cerebro	Jiang et al. 2004
Receptor de Rianodina (<i>RyR</i>)	Músculo esquelético	Kimura et al. 2005
Bomba de Ca^{2+} dependiente de ATP del retículo sarcoplasmático/endoplasmático 1 (<i>SERCA1</i>)	Músculo esquelético	Kimura et al. 2005
Bomba de Ca^{2+} dependiente de ATP del retículo sarcoplasmático/endoplasmático 2 (<i>SERCA2</i>)	Músculo esquelético	Kimura et al. 2005
Proteína con dominio PDZ de las bandas Z que sufre <i>splicing</i> alternativo (<i>ZASP</i>)	Músculo esquelético	Machuca-Tizli et al. 2006

Tabla 2. Genes que sufren fallos en el *splicing* alternativo en pacientes con DM1.

2.5. Proteínas de unión a ARN implicadas en la patogénesis de la DM1

Hasta la fecha dos familias de proteínas de unión a ARN han sido relacionadas con la patogénesis de la DM1: las proteínas MBNL (muscleblind-like) (Miller, Urbinati et al. 2000; Fardaei, Larkin et al. 2001; Ladd, Charlet et al. 2001) y las proteínas CELF (CUGBP and ETR-3-like factors). MBNL y CUG-BP son reguladores de *splicing*, con un efecto antagonista sobre dos transcritos con *splicing* aberrante en tejidos con DM1: *cTNT* e *IR* (Philips, Timchenko et al. 1998; Savkur, Philips et al. 2001; Ho, Charlet et al. 2004). En la DM1, el patrón de *splicing* observado para estos transcritos es consistente con bajos niveles de proteínas MBNL (Ladd, Stenberg et al. 2005) y altos niveles y actividad de CUG-BP1 (Philips, Timchenko et al. 1998; Savkur, Philips et al. 2001; Timchenko, Cai et al. 2001; Charlet, Savkur et al. 2002).

2.5.1. Proteínas MBNL

La familia de proteínas MBNL está compuesta por tres miembros: MBNL1, MBNL2 y MBNL3. Todas co-localizan con las fosas de ARN expandido de CTGs o de CCTGs (Miller, Urbinati et al. 2000; Mankodi, Urbinati et al. 2001; Fardaei, Rogers et al. 2002; Mankodi, Teng-Umnuy et al. 2003). El modelo de ganancia de función del ARN sugiere que MBNL1 está secuestrado en estas fosas de ARN y que por tanto su actividad disminuye. Existe un modelo de ratón con un *knockout* para las isoformas de *Mbnl1* que se unen a ARN (conocido como *Mbnl1^{ΔE3}*). Estos ratones presentan síntomas característicos de la DM1 como miotonía, núcleos centrales en las miofibras, cataratas y alteraciones en el *splicing* alternativo del Canal de Cloro, la Troponina cardíaca T y la Troponina T rápida de músculo esquelético (Kanadia, Johnstone et al. 2003). También se ha descrito que las proteínas MBNL regulan el *splicing* alternativo del Receptor de la Insulina y de la Troponina cardíaca T en cultivos celulares humanos (Ho, Charlet et al. 2004). El fenotipo de estos ratones que tienen un *knockout* para *muscleblind* apoya la hipótesis de que el secuestro y la pérdida de la función normal de Muscleblind es un factor crítico en la patogenicidad de la DM1. Esta hipótesis predice que alteraciones en los niveles de las proteínas Muscleblind deberían modular los fenotipos inducidos por el triplete CUG expandido.

2.5.2. CUG-BP1

La familia CELF está compuesta de factores de maduración del ARN que regulan el *splicing* alternativo de distintos transcritos y cuya expresión está regulada durante el desarrollo (Ladd, Charlet et al. 2001). Está compuesta por 6 miembros que tienen la misma estructura: tres dominios de unión a ARN compuestos de motivos de reconocimiento de ARN (RRM) y un dominio divergente de función desconocida (Ladd, Charlet et al. 2001) (Figura 3).



Figura 3. Estructura de las proteínas CELF. Los 6 miembros de la familia CELF están compuestos por tres dominios de reconocimiento y unión a ARN (RRM por RNA recognition motifs) y un dominio divergente de función desconocida (Figura tomada de (Philips, Timchenko et al. 1998)).

Estas proteínas regulan varios pasos durante la maduración de los transcritos tras la transcripción como el *splicing* alternativo, edición del ARN, iniciación de la traducción y la estabilidad del ARNm (Paillard, Omilli et al. 1998; Timchenko, Welm et al. 1999; Anant, Henderson et al. 2001; Ladd, Charlet et al. 2001; Mukhopadhyay, Houchen et al. 2003).

Uno de los miembros de la familia CELF es CUG-BP1 (CUG-binding protein 1). CUG-BP1 se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma (Timchenko, Miller et al. 1996; Timchenko, Timchenko et al. 1996) y se une específicamente a ARNms con repeticiones de UG (Takahashi, Sasagawa et al. 2000). CUG-BP1 regula la transcripción de p21 y MEF2A (myocyte enhancer factor 2A) (Timchenko, Patel et al. 2004), proteínas clave en la diferenciación del músculo esquelético. Las células con DM1 no tienen capacidad para salir del ciclo celular, lo cual es un paso necesario para la diferenciación muscular (Timchenko, Iakova et al. 2001). En DM1, la acumulación de ARN con el triplete CUG expandido conduce a un aumento de la actividad de CUG-BP1. Esto causa un aumento de la traducción de distintas proteínas necesarias para la biogénesis como las mencionadas p21 y MEF2A. Existe un modelo de ratón que sobre-expresa CUG-BP1 en el músculo esquelético (Timchenko, Patel et al. 2004), en estos ratones los altos niveles de CUG-BP1 causan la sobre-expresión de p21 y MEF2A lo cual produce distrofia y retraso en el desarrollo muscular de manera similar a lo que se observa en humanos con DM1.

En músculo esquelético (Savkur, Philips et al. 2001) y corazón (Timchenko, Cai et al. 2001) de pacientes con DM1 se han detectado altos niveles de expresión de CUG-BP, y se cree que esto contribuye a la patogénesis porque afectaría el *splicing* alternativo de pre-ARNm como el del *IR*, la *cTNT* y el *CIC-1* (Philips, Timchenko et al. 1998; Savkur, Philips et al. 2001; Charlet, Savkur et al. 2002). Existe un modelo de ratón transgénico que sobre-expresa CUG-BP1 en corazón y músculo esquelético. Estos ratones mueren tras el nacimiento, probablemente debido a disfunciones musculares e incapacidad de respirar. Por otro lado, estos ratones también muestran fallos en el *splicing* alternativo característicos de la DM1, ya que expresan formas fetales de cTNT, CIC-1 y MTMR1 (Ho, Bundman et al. 2005). Cabe destacar que hasta la fecha no existen evidencias de que los altos niveles de CUG-BP1 nuclear se

deban a que se encuentre secuestrado en las fosas que forma el ARN mutante expandido, ya que no se ha visto que co-localicen.

El balance entre MBNL y CUG-BP parece ser un punto clave en el desarrollo de la DM1 (Figura 4). El secuestro de Muscleblind ha sido demostrado en tejidos con DM1, DM2 (Miller, Urbinati et al. 2000; Mankodi, Urbinati et al. 2001; Fardaei, Rogers et al. 2002) y en los modelos que presentan el triplete CTG expandido (Lin, Miller et al. 2006). La importancia de la falta de función de MBNL1 ha sido también puesta de manifiesto en el modelo con el *knockout* de *Mbnl1* (Kanadia, Johnstone et al. 2003), aunque no se haya visto supresión o potenciación de los fenotipos producidos por la expresión del triplete expandido directamente. Por otro lado, en células con DM1 y en un modelo de ratón 3' UTR *DMPK* (CTG)₅ generado recientemente, se observa un aumento en los niveles de CUG-BP1, mientras que en el modelo de ratón HSA^{LR} y en la DM2 no se han detectado alteraciones en los niveles de CUG-BP1 (Lin, Miller et al. 2006; Mahadevan, Yadava et al. 2006). También es conocido que la sobre-expresión de CUG-BP1 causa fenotipos parecidos a los de la DM1 (Timchenko, Patel et al. 2004; Ho, Bundman et al. 2005), aunque la interacción no se ha comprobado en el contexto del triplete expandido. Por tanto, mientras que en la DM1 tanto los niveles de MBNL1 como de CUG-BP1 se ven modificados, la alteración de los niveles de una de las dos proteínas es suficiente para que se vea un efecto similar al de la DM1 tanto a nivel fisiológico como a nivel molecular (alterando el *splicing*). Parecería que hay una relación entre los efectos de MBNL1 y CUG-BP1 ya que la sobre-expresión de CUG-BP1 causa los mismos fallos en el *splicing* alternativo que la pérdida de MBNL1. En general CUG-BP1 promueve las isoformas fetales mientras que MBNL1 conduce a la expresión de isoformas adultas. Esto indica que tanto MBNL1 como CUG-BP1 parecen jugar un papel importante en el desarrollo de la patogénesis en la DM1 no habiéndose podido identificar aún si una es más importante que la otra ni si existen más proteínas implicadas.

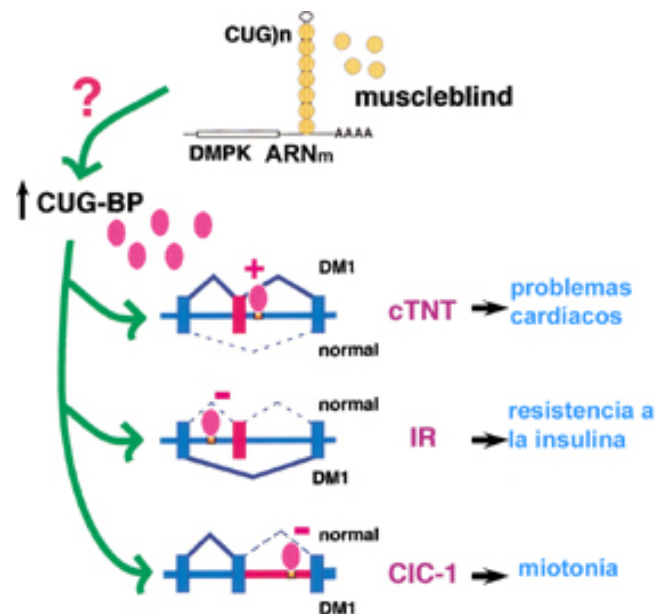


Figura 4. Modelo de patogénesis en DM1. El triplete de CUGs expandido en el ARN adopta estructura de doble cadena y queda retenido en el núcleo donde secuestra a Muscleblind. Por mecanismos desconocidos los niveles de CUG-BP aumentan. El descontrol de los niveles de Muscleblind y CUG-BP tiene como consecuencia fallos en el *splicing* alternativo de varios genes, tres mencionados en la figura, que causan algunos de los síntomas de la enfermedad. (Figura modificada de (Faustino and Cooper 2003)).

2.6. *Drosophila* como herramienta en el estudio de enfermedades humanas y búsqueda de modificadores

La mosca *Drosophila melanogaster* ha sido uno de los organismos modelo preferido por los genetistas desde principios del siglo XX. Al principio se utilizaba porque era fácil y barato trabajar con ellas, tenían un tiempo de generación de tan solo 10 días y producían mucha progenie. Posteriormente se descubrieron más ventajas para su uso en estudios genéticos como que no existe recombinación meiótica en machos y que tiene solo 4 cromosomas que se podían visualizar directamente en los cromosomas politénicos gigantes de las glándulas salivares de las larvas. Por otro lado, su exoesqueleto presenta una amplia gama de componentes externos como quetas, venas en las alas, y ojos compuestos que son fácilmente afectados con mutaciones y resultan en fenotipos mutantes fáciles de estudiar bajo la lupa de disección (St Johnston 2002). Hoy en día hay disponibles muchas técnicas y herramientas que permiten controlar la expresión génica y se conoce bien la anatomía y los fenotipos de *Drosophila*. Un gran número de procesos biológicos fundamentales

están conservados entre las moscas y los humanos y además tenemos disponible la secuencia de su genoma.

Una de las herramientas más importantes que provee *Drosophila* es que permite llevar a cabo *screens* genéticos a gran escala con mutaciones que afectan a genes conocidos. Existen colecciones con mutaciones de elementos P (elementos móviles transponibles) que causan mutaciones de falta de función y que cubren un gran número de genes del genoma de *Drosophila*. Las líneas con inserciones de elementos P tienen una o varias de estas mutaciones en genes conocidos. También hay disponibles líneas con deficiencias o deleciones que cubren un mayor número de genes. Por otro lado existen también colecciones de elementos EP (Rorth 1996) capaces de sobre-expresar los genes donde están insertadas (ver Materiales y Métodos).

En este estudio nos planteamos la generación de un modelo de DM1 en *Drosophila* que nos ayudara a entender mejor los mecanismos de la enfermedad. La generación de este modelo nos permite no solo ahondar en el conocimiento de las causas y el desarrollo de la DM1 sino también realizar fácilmente *screens* genéticos que pueden ser muy útiles para identificar nuevos genes implicados en la enfermedad. Los modelos de enfermedades humanas en *Drosophila* han demostrado ser una buena herramienta para estudiar mecanismos patogénicos de enfermedades humanas y para la identificación de nuevos genes implicados en distintas enfermedades (Fernandez-Funez, Nino-Rosales et al. 2000; Fortini and Bonini 2000; Zoghbi and Botas 2002; Shulman, Shulman et al. 2003).

3. OBJETIVOS

La generación de un modelo de DM1 en *Drosophila* nos permitiría ampliar el conocimiento de la enfermedad. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos:

- Crear un modelo de DM1 en *Drosophila* mediante generación de moscas transgénicas capaces de expresar un triplete de CTGs expandido en diferentes tejidos bajo el control del sistema GAL4-UAS.

- Caracterizar el fenotipo que pueda causar el triplete expandido en distintos tejidos, principalmente aquellos afectados en pacientes humanos como es el tejido muscular.

- Caracterizar posibles fallos en *splicing* alternativo como ocurre en pacientes con DM1

- Probar los efectos producidos por dos proteínas de unión a ARN, MBNL1 y CUG-BP1 que posiblemente participen en la patología de la DM1. Para estudiar los efectos de MBNL1y CUG-BP1 sobre el fenotipo de los CTGs expandidos se generarán líneas transgénicas que expresen las proteínas humanas en *Drosophila* bajo el control del sistema GAL4-UAS. Mediante cruces genéticos se generarán moscas que expresen simultáneamente el triplete de CTGs expandido y CUG-BP1 o MBNL1 en tejido muscular o en el sistema nervioso y se estudiará si son capaces de suprimir o potenciar el fenotipo producido por el triplete de CTGs expandido.

- Probar otros genes para intentar descubrir nuevos modificadores del fenotipo. Para probar nuevos genes usaremos dos planteamientos distintos. El primero consistirá en un *screen* genético dirigido, ya que, teniendo en cuenta que la patología en DM1 se produce por una ganancia de función del ARN, probaremos una colección de líneas que contienen mutaciones en proteínas de unión a ARN en *Drosophila*. Se comprobará si alguna es capaz de modificar el fenotipo del triplete de CTGs expandido. El segundo planteamiento consistirá en un *screen* no dirigido en el que se probarán dos colecciones de mutaciones que cubren un gran porcentaje del genoma de *Drosophila*: una es una colección de elementos P y la otra es una colección de deficiencias que cubre alrededor del 60% del genoma de la mosca.

- Por último caracterizar aquellos modificadores para los que se obtengan los resultados más interesantes.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Sistema GAL4-UAS

El sistema GAL4-UAS (Brand and Perrimon 1993) nos permite dirigir la expresión de una proteína de interés bajo un patrón de expresión deseado. Este sistema utiliza el factor de transcripción de levaduras GAL4 y la unión de esta proteína a secuencias reguladoras UAS (upstream activation sequences) que son sitios de unión de la proteína GAL4. Por un lado disponemos de líneas transgénicas que tienen insertado en su genoma construcciones en las que la región codificante de la proteína GAL4 está bajo el control de regiones reguladoras conocidas (*enhancers* o promotores). Estas líneas se conocen como *drivers*. Hoy en día existe una gran colección de líneas o *drivers* que expresan GAL4 en un amplio patrón específico de células y de tejido donde elegir. Por otro lado generamos líneas transgénicas en las que clonamos la secuencia del gen de interés bajo el control de las secuencias reguladoras de transcripción UAS. Al cruzar ambas líneas obtenemos moscas con las dos construcciones.

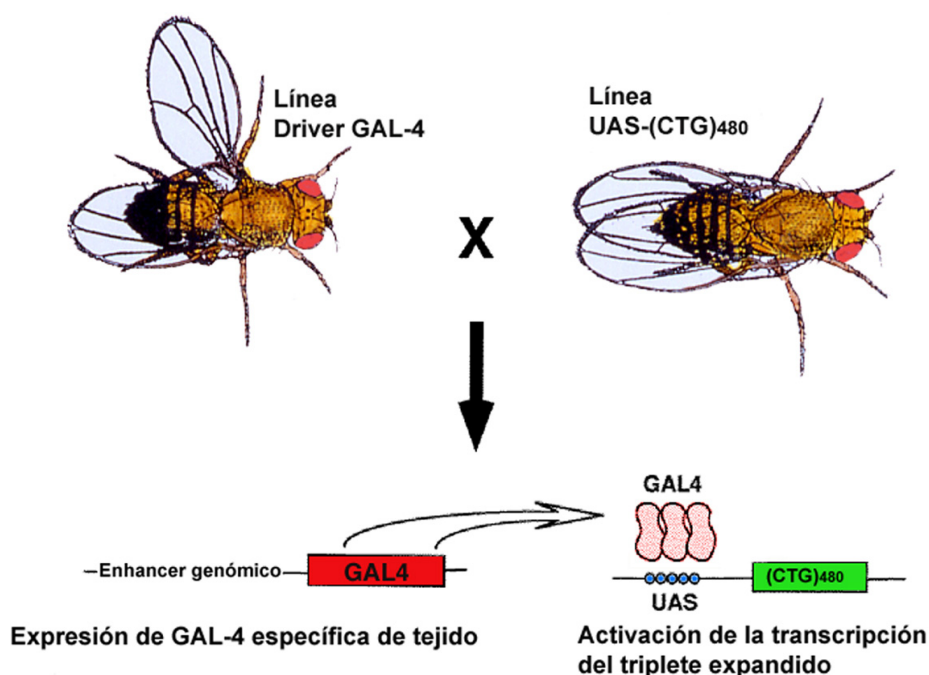


Figura 5. Sistema GAL4-UAS. Las líneas GAL4 expresan la proteína GAL4 en tejidos y momentos del desarrollo específicos. La proteína GAL4 se une a los 5 sitios de unión UAS y se produce la expresión controlada de (CTG)₄₈₀.

En estos animales se expresará la proteína GAL4 según su patrón, esta proteína GAL4 se unirá a las secuencias reguladoras UAS que dirigirán la expresión

del gen de interés. El sistema GAL4-UAS nos permite la expresión de proteínas de interés en tejidos y momentos del desarrollo específicos del *enhancer* elegido (Figura 5). Por otro lado este sistema es sensible a la temperatura por lo que a mayores temperaturas obtenemos mayores niveles de expresión, lo que nos permite todavía más control sobre la expresión del gen deseado.

4.2. Generación de líneas transgénicas

En primer lugar se generaron moscas con un transgén que contiene 5 sitios de unión a UAS seguido de 480 repeticiones de CTGs. La construcción UAS-(CTG)₄₈₀ se generó mediante la clonación de repeticiones de CTGs interrumpidas compuestas por unidades repetidas de la secuencia (CTG)₂₀CTCGA dentro del vector de expresión de *Drosophila* pUAST (Figura 6). Una sola copia de esta secuencia fue clonada también dentro del vector pUAST para generar moscas control. También utilizamos moscas con 200 repeticiones de CTG. La construcción UAS-(CTG)₂₀₀ fue generada previamente en el laboratorio mediante la clonación de un fragmento de 1.4 kb de la región 3' del gen *DMPK* con 200 repeticiones de CTG dentro del vector pUAST-GFP. La construcción UAS-MBNL1 se generó mediante clonación de la isoforma de 41 kDa de la proteína humana MBNL1 a la que se añadió un epítipo Xpress (de Invitrogen) en el extremo N terminal dentro del vector pUAST. La construcción UAS-CUG-BP1 se generó por clonación de la proteína humana CUG-BP1 dentro del vector pUAST. Todas estas secuencias fueron proporcionadas por el Dr. Thomas Cooper de Baylor College of Medicine.

Las líneas transgénicas fueron establecidas mediante inyección en células de la línea germinal de embriones siguiendo el método estándar de inyección de embriones. Los embriones inyectados tienen un fondo mutante para el gen *w*⁻ lo que hace que no tengan color de ojo. El vector de expresión de *Drosophila* pUAST tiene una copia salvaje del gen *w*⁺ por lo que usamos este marcador para identificar las moscas transgénicas obtenidas, que tendrán color de ojo (distinto del blanco).

ocurran eventos de recombinación y se pueda perder la inserción en futuras generaciones.

Antes de proceder con la caracterización del fenotipo provocado por la inserción (CTG)₄₈₀ se llevó a cabo una amplificación del fragmento insertado en las distintas líneas transgénicas mediante PCR para asegurarnos de que el tamaño del inserto era el adecuado y se realizó una secuenciación del inserto usando primers dentro del vector pUAST para asegurarnos de que la secuencia era correcta.

Tras seguir el mismo proceso de inyección para las construcciones con MBNL1 y CUG-BP1 se obtuvieron 10 líneas transgénicas con la inserción UAS-MBNL1 y 7 líneas con la inserción UAS-CUG-BP1. Se balancearon mediante los mismos cruces que la inserción (CTG)₄₈₀. Se amplificó ADN obtenido de las líneas transgénicas con MBNL1 y CUG-BP1 y se secuenció usando los mismos primers dentro de la secuencia de pUAST. Para comprobar si las construcciones de MBNL1 y CUG-BP1 están siendo traducidas correctamente se realizaron experimentos de detección de proteínas mediante Western Blot. El anticuerpo anti-Xpress detecta la proteína MBNL1 de 41kDa (Figura 7), mientras que el anticuerpo anti-CUG-BP1 detecta la banda correspondiente a la proteína CUG-BP1 de unos 52 kDa (Figura 8).

UAS-(CTG)₄₈₀

Línea	COLOR	Cromosoma	Fenotipo con GMR-GAL4 a 25°C
M5M	Naranja	III	Débil
M5Q	Naranja	II	Medio
M5O	Naranja oscuro	II	Medio-fuerte
M5S	Naranja	X	No
M5T	Naranja	III	Fuerte
M5L	Naranja	III	Débil
M5B	Naranja oscuro	II,III	Débil
M5E	Naranja oscuro	II,III	Medio
M5G	Naranja oscuro	II	Débil
M5I	Rojo	II	Débil
M5P	Rojo	II,III	Fuerte
M7A	Naranja	II	Medio
M13A	Rojo	Línea perdida	
M13B	Naranja	III	Medio-fuerte
M13D	Naranja	II	Medio-fuerte

UAS-MBNL1

Línea	COLOR	Cromosoma	Fenotipo con GMR-GAL4 a 25°C
M10G	Naranja oscuro	III	No
M10M	Naranja	II	Medio
M10A	Rojo	II	Fuerte
M10T	Naranja oscuro	II,III	Débil
M10U	Naranja oscuro	II	Fuerte
M10B	Naranja oscuro	Línea perdida	
M10K	Naranja	II,III	Fuerte
M11A	Naranja	II	Débil
M9A	Naranja	II	No
M6A	Amarillo	III	No
M6B	Naranja	II	Medio-fuerte

UAS-CUG-BP1

Línea	COLOR	Cromosoma	Fenotipo con GMR-GAL4 a 25°C
M2A	Naranja	II	Medio-fuerte
M2E	Naranja	III	Medio-fuerte
M2N	Rojo	III	Letal
M2I	Naranja	III	Medio-fuerte
M2Ñ	Naranja	III	No
M2G	Amarillo	III	Medio-fuerte
M2L	Rojo	II,III	Letal

Tabla 3. Resumen de líneas transgénicas obtenidas. Descripción detallada de las líneas obtenidas para cada uno de los transgenes inyectados, cromosoma en el que se encuentra la inserción y caracterización usando el fenotipo producido en el ojo con el *driver* GMR-GAL4.

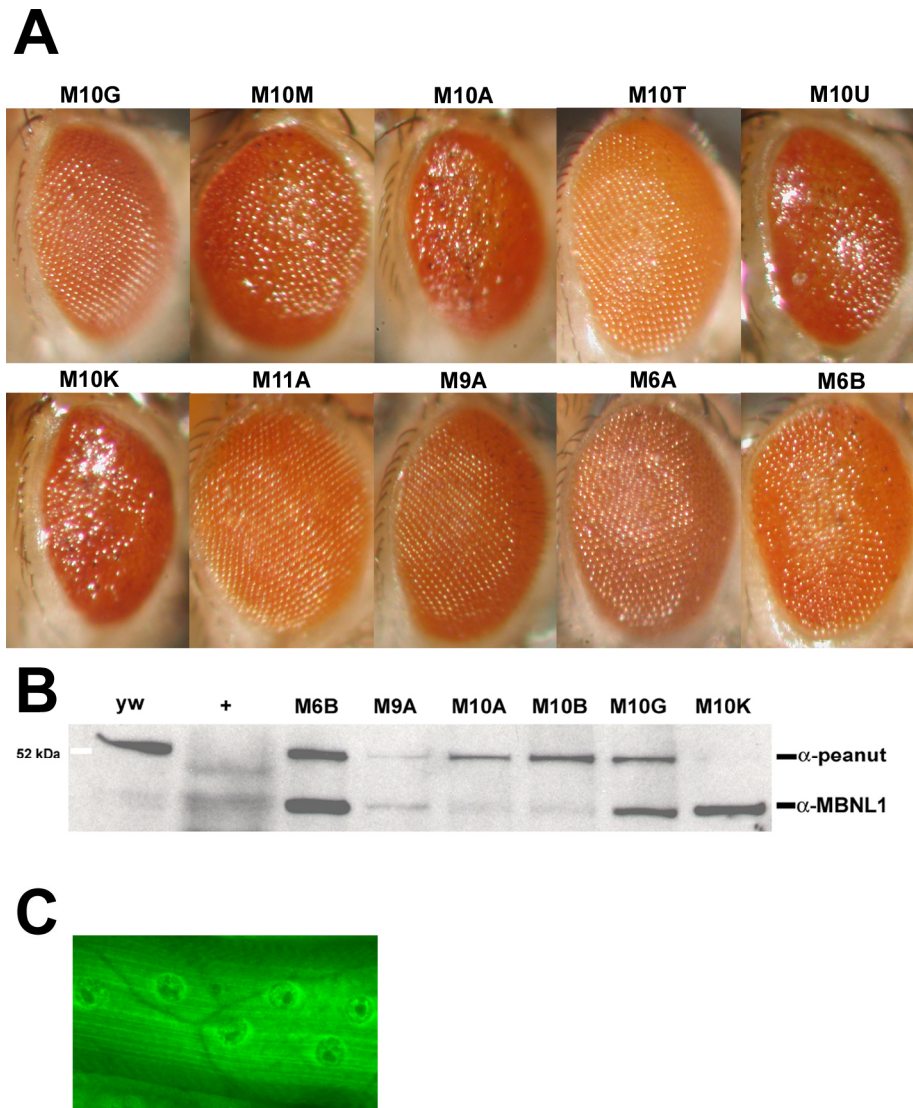


Figura 7. Caracterización de las líneas transgénicas para MBNL1. **A.** Imágenes de ojo fresco del fenotipo de ojo producido por la expresión de UAS-MBNL1 con el *driver* de ojo GMR-GAL4 a 25°C. En la parte de arriba se indica el nombre de las líneas. **B.** Western Blot que muestra los distintos niveles de expresión de la proteína MBNL1 de algunas de las líneas en el sistema nervioso de *Drosophila* con el *driver* elav-GAL4. El anticuerpo α -peanut se utilizó como control. **C.** Inmuofluorescencia con anticuerpo anti-MBNL1 de músculos larvarios que expresan MBNL1 bajo el control del *driver* MHC-GAL4.

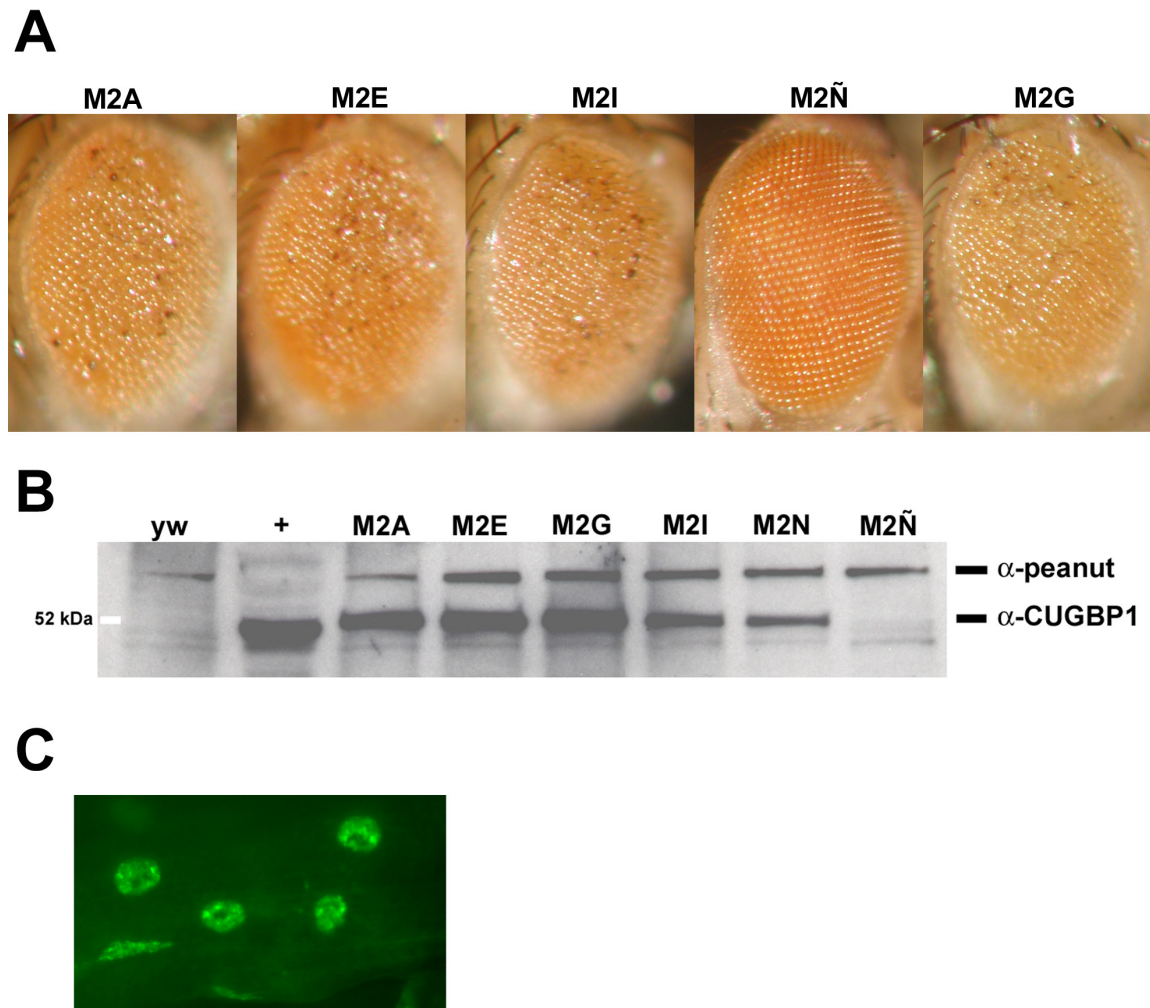


Figura 8. Caracterización de las líneas transgénicas para CUG-BP1. **A.** Imágenes de ojo fresco del fenotipo de ojo producido por la expresión de UAS-CUG-BP1 con el *driver* de ojo GMR-GAL4 a 25°C. En la parte de arriba se indica el nombre de las líneas. **B.** Western Blot que muestra los distintos niveles de expresión de la proteína CUG-BP1 de algunas de las líneas en el sistema nervioso de *Drosophila* con el *driver* elav-GAL4. El anticuerpo α-peanut se utilizó como control. **C.** Inmuofluorescencia con anticuerpo anti-CUGBP1 de músculos larvarios que expresan CUG-BP1 bajo el control del *driver* MHC-GAL4.

4.3. Microscopía electrónica de barrido de los ojos de *Drosophila*

Para la adquisición de imágenes en el microscopio electrónico de barrido, las moscas fueron procesadas mediante métodos establecidos de deshidratación en etanol, secado de punto crítico y montaje para análisis en un microscopio *Jeol JSM 6100*.

4.4. Secciones semifinas de tórax de adulto de *Drosophila*

El tórax de adulto se separa del resto de la mosca, se fijan las muestras durante la noche en buffer de glutaraldehído-paraformaldehído-cacodilato. Se lavan y se fijan durante dos horas a 4°C en tetróxido de osmio 1%. Se deshidratan en series de etanol, y se meten en bloques de resina EPON a 65°C durante la noche. Se realizan las secciones semi-finas transversales de 1 μ m y se tiñen con Multiple Stain Solution (de Polysciences). Con esta tinción se obtienen resultados parecidos a la tinción con hematoxilina-eosina. El proceso de tinción de los distintos genotipos a comparar se hace simultáneamente para evitar diferencias en la tinción. Se realizan secciones de por lo menos 8 moscas por genotipo para cada observación. Se toman fotografías bajo el microscopio óptico.

4.5. Hibridación *in situ* e inmunofluorescencia de músculos de larva en *Drosophila*

Para la inmunofluorescencia, se diseccionan las larvas en PBS y se fijan en paraformaldehído 4% en PBS. Tras lavar con PBS y bloquear con BSA 2% se incuban el tejido con uno de los siguientes anticuerpos primarios: anti-CUG-BP1 3B1 (1:500, de Upstate), anti-Xpress tag (1:200, de Invitrogen), anti-CBP (1:1000, proporcionado por el Dr. Mattias Mannervik), anti-LaminaC (1:50, del Hybridoma Bank), Faloidina (1:200, de Sigma). Se lava de nuevo y se hibrida con anticuerpos secundarios (obtenidos de Jackson Immunoresearch Laboratories y de Molecular Probes).

En el experimento de hibridación *in situ* e inmunofluorescencia, tras la fijación el tejido se vuelve a fijar con formamida 40%/1xSSC, se hibrida con una sonda (CAG)₅ marcada con Cy3 a una concentración de 1ng/ μ l y se lava para continuar con el protocolo de inmunofluorescencia. Se observan al menos 8 larvas y 50 núcleos de cada larva. Las imágenes se captan en un microscopio confocal.

4.6. Comparación cuantitativa de núcleos con distintos tipos de fosas nucleares

Para realizar comparaciones en el número de fosas nucleares se estudian al menos 4 larvas y una media de 200 núcleos por larva. No se encontró en ningún genotipo un núcleo sin fosas nucleares (con excepción de los controles sin (CUG)₄₈₀). En cuanto al análisis de los datos, las barras de error en las gráficas representan la

desviación estándar. Los datos se analizaron utilizando el test t de Student, $p=0.006$ en todos los grupos.

4.7. Análisis del *splicing* alternativo

Se realizaron estudios de comparación entre el genoma humano y el de *Drosophila* para encontrar los genes homólogos de los genes cuyo *splicing* alternativo está alterado en pacientes con DM1 en *Drosophila*. Una vez encontrados, se realizó el análisis de las secuencias que codifican para cada proteína para dilucidar si sufren *splicing* alternativo en *Drosophila* como ocurre en humanos. Una vez dilucidado el patrón de *splicing* alternativo de cada uno de los genes se diseñaron primers en regiones que flanquean a los exones que sufren *splicing* alternativo. Se extrajo ARN de tejido muscular y se realizó RT-PCR para ver si existen diferencias en el radio de las isoformas obtenidas de ARN extraído de moscas control o de moscas que expresan (CUG)₄₈₀. Los productos obtenidos tras la amplificación por reacciones de RT-PCR se resolvieron mediante electroforesis en geles de acrilamida al 4%. Los fragmentos se visualizaron con Bromuro de Etidio (1µg/ml) en un transiluminador de luz ultravioleta.

Se recogieron muestras de ARN de tórax seccionados de moscas control y moscas que expresan (CUG)₄₈₀ en el músculo en distintos momentos del desarrollo de la mosca: larvas de tercer estadio y adultos a la edad de 1, 5 y 10 días.

4.8. Screens genéticos para la búsqueda de modificadores

Para llevar a cabo los *screens* genéticos realizados para buscar modificadores del fenotipo inducido por el triplete de CUGs expandido se utilizó una línea que expresa (CUG)₄₈₀ en el ojo bajo el control de GMR-GAL4. Se cruzaron machos o hembras de esta línea con machos o hembras de las colecciones de elementos P (Bloomington), de deficiencias (Exelixis, (Parks, Cook et al. 2004)), y algunos elementos EP (Szeged). Los elementos P y las deficiencias son mutaciones de falta de función de uno (elementos P) o varios (deficiencias) genes. Los elementos EP llevan sitios de unión UAS en uno de los extremos del elemento P lo que hace que los genes cercanos a su sitio de inserción puedan ser activados por GAL4 (Rorth 1996). Si un elemento EP está insertado cerca de la región promotora de un gen de interés y en la misma dirección obtendremos sobre-expresión de este gen al cruzar la línea con una

línea GAL4. Si el elemento EP está insertado dentro de un gen pero en la dirección opuesta a la de su traducción se obtendrá una mutación por falta de función. Todos los cruces se llevaron a cabo en incubadores a 25°C y los ojos de la progenie se observaron bajo la lupa de disección.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterización de los fenotipos obtenidos con las moscas (CTG)₄₈₀

5.1.1. La expresión de (CTG)₄₈₀ en el ojo de *Drosophila* causa degeneración

El ojo de *Drosophila* es un sistema que se usa con frecuencia para comprobar la toxicidad de inserciones en el genoma. Por ello y para comprobar los fenotipos de las distintas líneas obtenidas para la inserción de (CTG)₄₈₀, se cruzaron las líneas obtenidas con el *driver* GMR-GAL4 que dirige la expresión en el ojo desde larva de tercer estadio en adelante (Figura 9).

Se caracterizaron las diferentes líneas a 25 y 27°C y se eligió una línea que en el futuro nos fuera a ser útil para identificar modificadores tanto por supresión como por potenciación del fenotipo dependiendo de la temperatura a la que se haga el experimento.

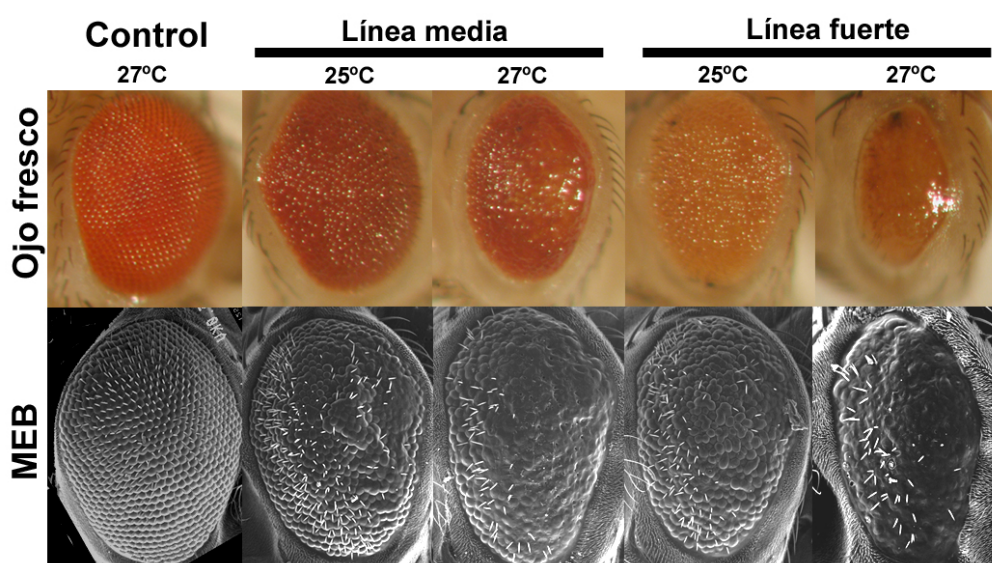


Figura 9. Caracterización de los fenotipos de ojo producidos por el transgén UAS-(CTG)₄₈₀ en el ojo. Imágenes tomadas en el microscopio de disección (Ojo fresco) o en el microscopio electrónico de barrido (MEB) de ojos que expresan el transgén UAS-(CTG)₄₈₀ a distintas temperaturas. Las líneas caracterizadas como medias presentan un fenotipo de ojo de desorganización y fusión de omatidios tanto a 25 como a 27°C. El fenotipo de las líneas caracterizadas como fuertes está más acentuado a ambas temperaturas, la desorganización y fusión de omatidios es más fuerte, como también lo es la pérdida de quetas. Por otro lado el tamaño del ojo de las líneas fuertes está considerablemente reducido, especialmente si lo comparamos con el ojo control.

Con objeto de poder caracterizar el fenotipo causado en el ojo se realizaron fotografías en el microscopio electrónico de barrido que muestran como la expresión de (CTG)₄₈₀ en el ojo causa desorganización y fusión de omatidios así como pérdida y duplicación de las quetas entre los omatidios. Los ojos que expresan (CTG)₄₈₀ también muestran un tamaño más pequeño que los controles (Figura 10).

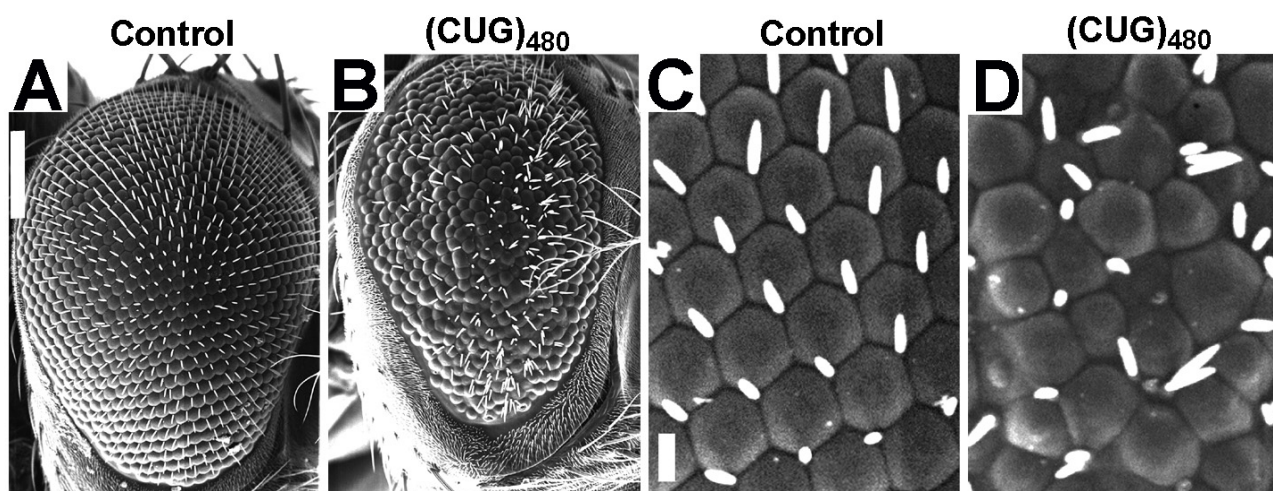


Figura 10. Fenotipo de degeneración en el ojo producido por la expresión de (CUG)₄₈₀. Imágenes de microscopio electrónico de barrido (MEB) de moscas control o moscas que expresan (CUG)₄₈₀. Los ojos control tienen una organización normal de los omatidios y las quetas entre estos (A, C), mientras que en los ojos que expresan (CUG)₄₈₀ se produce fusión y pérdida de organización de los omatidios (D) así como pérdida de quetas y reducción del tamaño del ojo (B). Escala: 100 μm en A-B y 10 μm en C-D.

5.1.2. El triplete CUG expandido se acumula en fosas nucleares en los músculos larvarios de *Drosophila*

Para investigar el efecto de (CUG)₄₈₀ en el músculo somático se expresó la inserción utilizando un *driver* específico de tejido que utiliza el promotor del la cadena pesada de la miosina (MHC-GAL4) y que está activo desde los músculos embrionarios en adelante. Uno de los puntos claves en la patología de la DM1 es la acumulación de los transcritos con CUGs expandidos en fosas nucleares. Se caracterizó la acumulación del ARN expandido usando una sonda anti-CUG marcada con Cy3. Se observa formación de fosas nucleares en núcleos de músculos de larvas de tercer estadio, mientras que no se observan fosas en animales control (Figura 11).

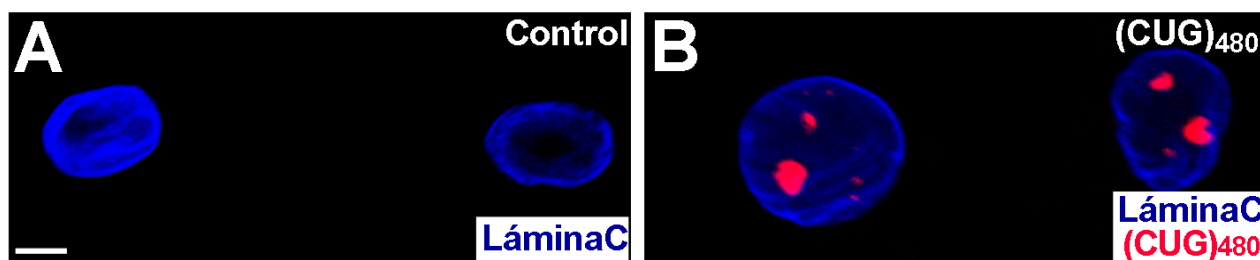


Figura 11. El ARN con el triplete expandido de CUGs se acumula en fosas nucleares en músculos de larva de *Drosophila*. Imágenes de microscopía confocal de núcleos control o núcleos que expresan (CUG)₄₈₀. El ARN expandido se acumula en fosas nucleares en los músculos larvarios como se ve cuando se realiza una hibridación *in situ* con una sonda fluorescente (CAG)₅ (en rojo en B) combinada con tinción de inmunofluorescencia con anti-LaminaC para visualizar el núcleo celular (en azul en A y B). Núcleos control en A sin expresión del ARN expandido no presentan indicios de fosas nucleares. Escala: 5µm.

5.1.3. La expresión de (CTG)₄₈₀ causa degeneración y pérdida de masa muscular en *Drosophila*

Para ver como está afectado el músculo somático adulto de *Drosophila* por la toxicidad del triplete expandido, se estudiaron los músculos de las moscas adultas. Lo primero que llama la atención es la incapacidad de las moscas que expresan (CUG)₄₈₀ para volar desde día 1. Cortes histológicos realizados en estas moscas no muestran señales de degeneración muscular. A día 10, las moscas (CUG)₄₈₀ presentan degeneración muscular y vacuolización de los músculos de vuelo indirectos (MVI) y pérdida de la estructura de las fibras musculares (Figura 12-B, E). A día 20, el fenotipo de degeneración y pérdida de masa muscular es más severo, la masa muscular presenta una matriz de miofibras dispersa y la estructura de las fibras se pierde. Los núcleos aparecen dispersos en esta matriz (Figura 12-C, F). Este fenotipo de degeneración se puede ver también al teñir con faloidina MVI diseccionados de tórax de adultos de *Drosophila* ya que la faloidina marca los filamentos de actina de las fibras musculares (Figura 12, G-H).

Por el contrario moscas de la misma edad que no expresan (CUG)₄₈₀ (Figura 12-A, D), o que expresan (CUG)₂₀ o (CUG)₂₀₀ (Figura 13), no presentan ningún fenotipo muscular.

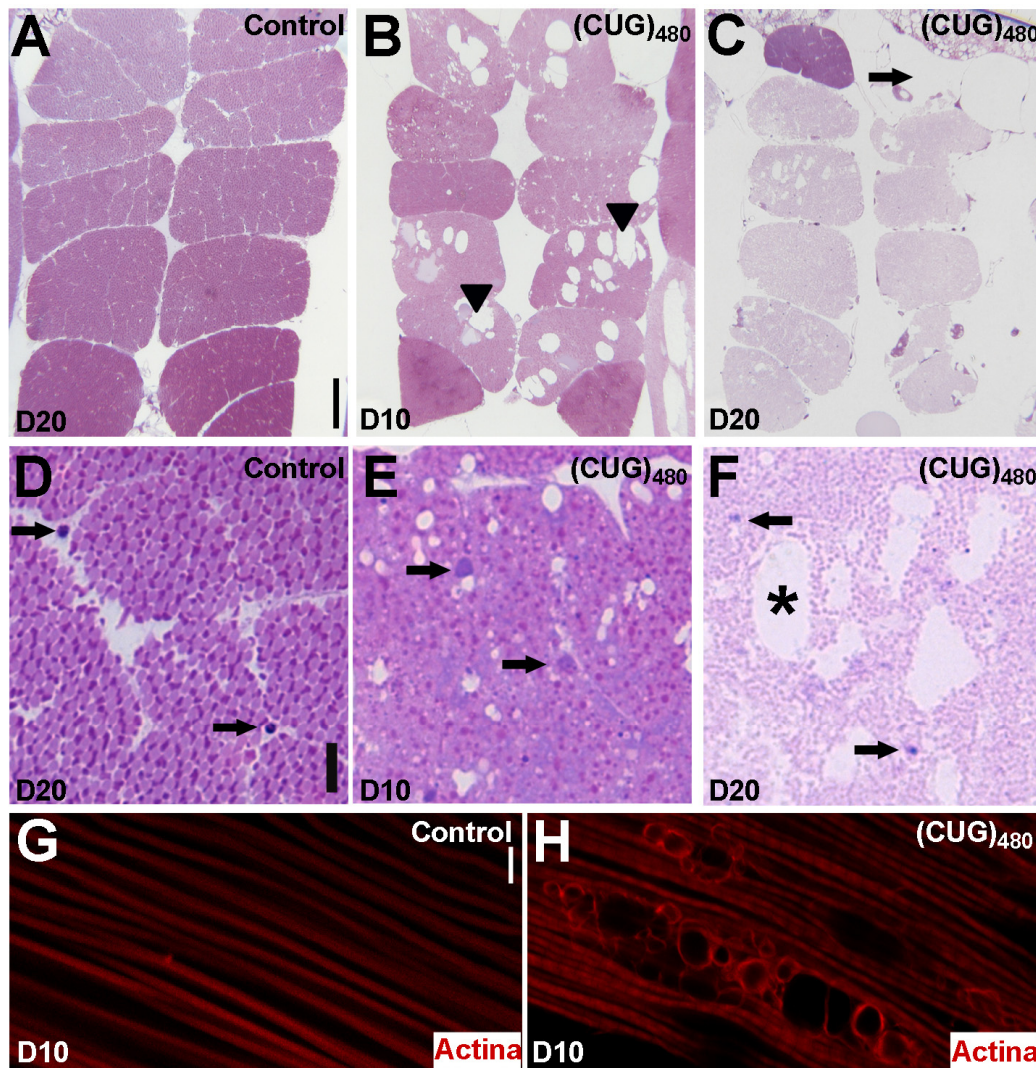


Figura 12. La expresión de (CUG)₄₈₀ en el músculo adulto de *Drosophila* causa degeneración muscular progresiva. (A-F) Secciones transversales en resina de tórax de moscas adultas control o moscas que expresan (CUG)₄₈₀. Los músculos de vuelo indirectos (MVI) de moscas control a día 20 muestran una organización normal (A), con las fibras musculares correctamente estructuradas. Los núcleos se localizan en la periferia de las fibras musculares (flechas en D). Las moscas que expresan (CUG)₄₈₀ muestran vacuolización del tejido (puntas de flecha) y desorganización muscular a día 10 (B). Con una mayor magnificación se puede ver pérdida de organización de las fibras (las flechas señalan a los núcleos en E). A día 20 la densidad de miofibras por músculo es menor y algunos músculos han desaparecido (flecha en C). La pérdida de organización de las fibras y la vacuolización (asterisco) ha empeorado (las flechas señalan núcleos en F). (G-H) Tinción con faloidina de MVI de moscas control o moscas que expresan (CUG)₄₈₀. A día 10 las moscas control tienen una organización normal de las fibras de actina (G), mientras que las moscas que expresan (CUG)₄₈₀ a la misma edad presentan vacuolización (H). Escala: 50 µm en A-C, 10 µm en D-F y 50 µm en G, H.

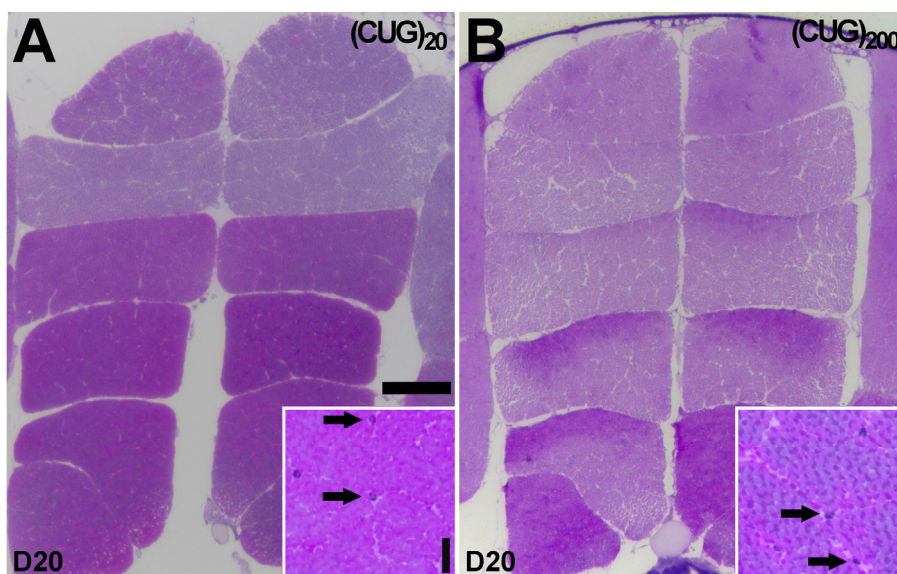


Figura 13. La sobre-expresión de (CUG)₂₀ o (CUG)₂₀₀ no causa degeneración muscular. Secciones semi-finas transversales de tórax de moscas que expresan (CUG)₂₀ (A) o (CUG)₂₀₀ (B) a día 20 muestran una organización muscular normal. No se observan indicios de vacuolización ni degeneración de los MVI. La localización periférica normal de los núcleos se ve en los recuadros con las imágenes de mayor aumento (flechas). Escala 50µm (10 µm en los recuadros).

Por lo tanto, la expresión de (CUG)₄₈₀, causa pérdida de función de los MVI así como degeneración muscular progresiva.

5.2. Alteraciones en los niveles de MBNL1 y CUG-BP1 modifican los fenotipos de las moscas (CTG)₄₈₀

5.2.1. Alteraciones en los niveles de la proteína Muscleblind modifican el fenotipo de ojo causado por la expresión de (CUG)₄₈₀ en *Drosophila*

Ya que, como se mencionaba en la introducción, las proteínas MBNL están implicadas en la patogeneicidad de la DM1, se investigó si alterando los niveles de las proteínas Muscleblind se podía modular la toxicidad inducida por la inserción (CTG)₄₈₀. Cuando expresamos (CUG)₄₈₀ en un fondo mutante para la proteína Muscleblind (Mbl) de *Drosophila* en heterocigosis, observamos una agravación del fenotipo de ojo. Esta mutación de falta de función potencia el fenotipo de desorganización y fusión de omatidios y reduce el tamaño del ojo (Figura 14-C).

Para probar la hipótesis de que los fenotipos que induce la expresión de (CUG)₄₈₀ son causados por el secuestro y pérdida de función de Muscleblind, se investigaron las consecuencias de aumentar sus niveles. Para ello usamos las moscas transgénicas que sobre-expresan la proteína humana MBNL1.

Como se ve en la figura 14-B la sobre-expresión de MBNL1 suprime dramáticamente el fenotipo de ojo inducido por (CUG)₄₈₀, tanto en relación al tamaño del ojo como en la organización de los omatidios.

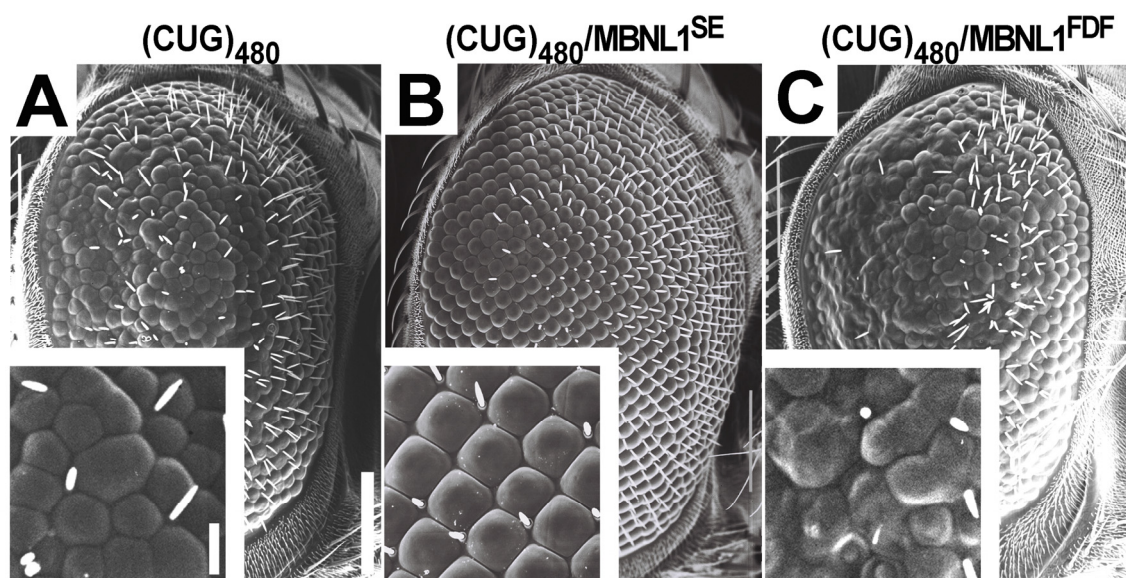


Figura 14. Los niveles de Muscleblind modifican el fenotipo inducido por (CUG)₄₈₀. Imágenes de MEB de ojos que expresan (CUG)₄₈₀ (A), (CUG)₄₈₀ y sobre-expresión de MBNL1 (B) o (CUG)₄₈₀ y una mutación en heterocigosis del gen *muscleblind* de *Drosophila* (C). Las moscas que expresan (CUG)₄₈₀ y un transgén UAS-LacZ control presentan desorganización y fusión de omatidios así como tamaño del ojo reducido (A). Este fenotipo es suprimido por la sobre-expresión de MBNL1 (B). El fenotipo es potenciado en moscas que tienen una mutación de falta de función para *muscleblind* en heterocigosis (C). Escala: 100 µm en A-C (10 µm en los recuadros con las magnificaciones). SE=sobre-expresión, FDF=falta de función.

5.2.2. La sobre-expresión de MBNL1 suprime la toxicidad muscular inducida por la expresión de (CUG)₄₈₀

Tras los resultados obtenidos en el ojo investigamos si la sobre-expresión de MBNL1 también es capaz de rescatar el fenotipo inducido por el triplete expandido en el músculo somático. Examinamos moscas a día 20 que co-expresan (CUG)₄₈₀ y MBNL1 en el músculo con el *driver* MHC-GAL4. Como se ve en la figura 15, los

MVI de las moscas (CUG)₄₈₀ presentan una desorganización severa de las fibras musculares, así como una distribución errática de la matriz de miofibras, donde se observa vacuolización y núcleos dispersos. Por el contrario, los músculos de las moscas (CUG)₄₈₀ que sobre-expresan MBNL1 a niveles adecuados no presentan apenas vacuolización, tienen la matriz de miofibras bien desarrollada y la estructura de los MVI está intacta con los núcleos localizados en la periferia de las fibras musculares.

El fenotipo de músculo de las moscas (CUG)₄₈₀ es 100% penetrante, y también se observa rescate en todas las moscas (CUG)₄₈₀ que sobre-expresan MBNL1. Se cuantificó la capacidad de MBNL1 para rescatar el fenotipo mediante el conteo de MVI, comparando MVI independientes normales y anormales. En las moscas (CUG)₄₈₀ de día 20 la mayoría de los MVI son anormales. Solo presentan 5 de 35 (14.3%) músculos de apariencia normal. Por el contrario, en las moscas (CUG)₄₈₀ que sobre-expresan MBNL1 de la misma edad se observa claramente la capacidad de MBNL1 de rescatar los fenotipos musculares ya que 60 de 67 (89.5%) parecen normales.

A tener en cuenta está el hecho de que niveles muy altos de expresión obtenidos en algunas de las líneas que expresan MBNL1 en ausencia de (CUG)₄₈₀ causan también fenotipos musculares (datos no mostrados). Esto sugiere que los niveles de MBNL1 son importantes para la fisiología del músculo.

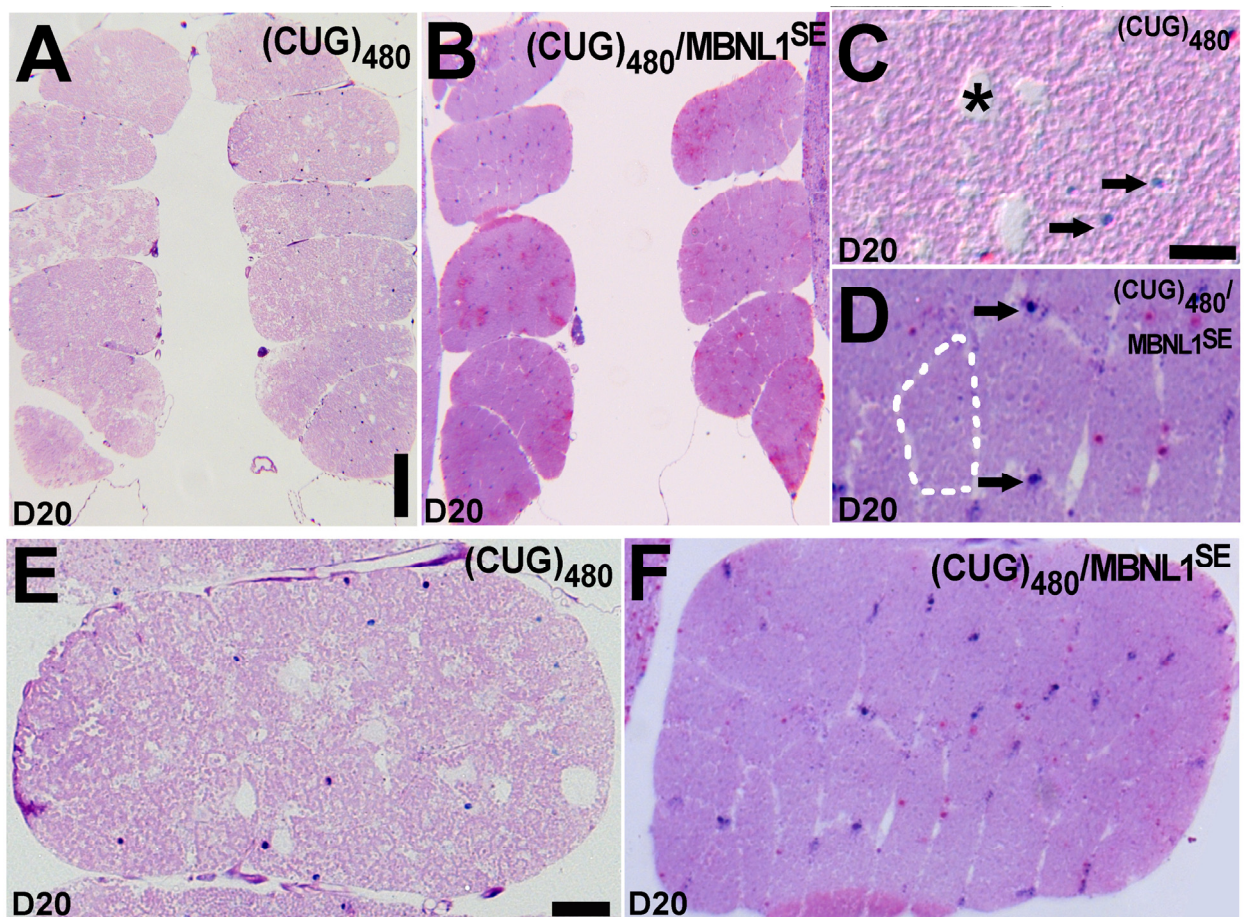


Figura 15. La sobre-expresión de MBNL1 suprime el fenotipo muscular inducido por (CUG)₄₈₀. Secciones transversales semi-finas de MVI adultos de moscas (CUG)₄₈₀ control o moscas que co-expresan (CUG)₄₈₀ y MBNL1. A día 20 las moscas control (CUG)₄₈₀ presentan una patología muscular obvia (A, C y E) que queda suprimida al expresar MBNL1 (B, D, y F). Las fibras están bien organizadas, y la densidad de miofibras por músculo es mayor en las moscas rescatadas con MBNL1 (el punteado en D marca una fibra muscular bien estructurada) en comparación con las moscas (CUG)₄₈₀ control donde hay vacuolización (asterisco), la estructura de las fibras se ha perdido y los núcleos aparecen dispersos en la matriz (C). Las flechas señalan los núcleos en C y D. Escala: 50 μ m en A-B, 10 μ m en C-F. SE=sobre-expresión.

5.2.3. La proteína MBNL1 co-localiza con las fosas nucleares de CUGs y modifica su número

Ya que se conoce que las proteínas MBNL co-localizan con las fosas nucleares de CUGs en células con DM1, decidimos estudiar la distribución de MBNL1 en el músculo somático de moscas (CUG)₄₈₀. En ausencia de (CUG)₄₈₀, MBNL1 se presenta difusa en el citoplasma celular (Figura 16-E). Por el contrario, en moscas que expresan tanto MBNL1 como (CUG)₄₈₀ no se detecta MBNL1 difuso sino

que se encuentra secuestrado en las fosas nucleares (Figura 16-C). Cuando se procede a comprobar si la sobre-expresión de MBNL1 afecta la distribución de las fosas nucleares, se observa un descenso en el número de fosas por núcleo al comparar moscas que sobre-expresan MBNL1 y (CUG)₄₈₀ con moscas que solo expresan (CUG)₄₈₀ (Figura 16-F).

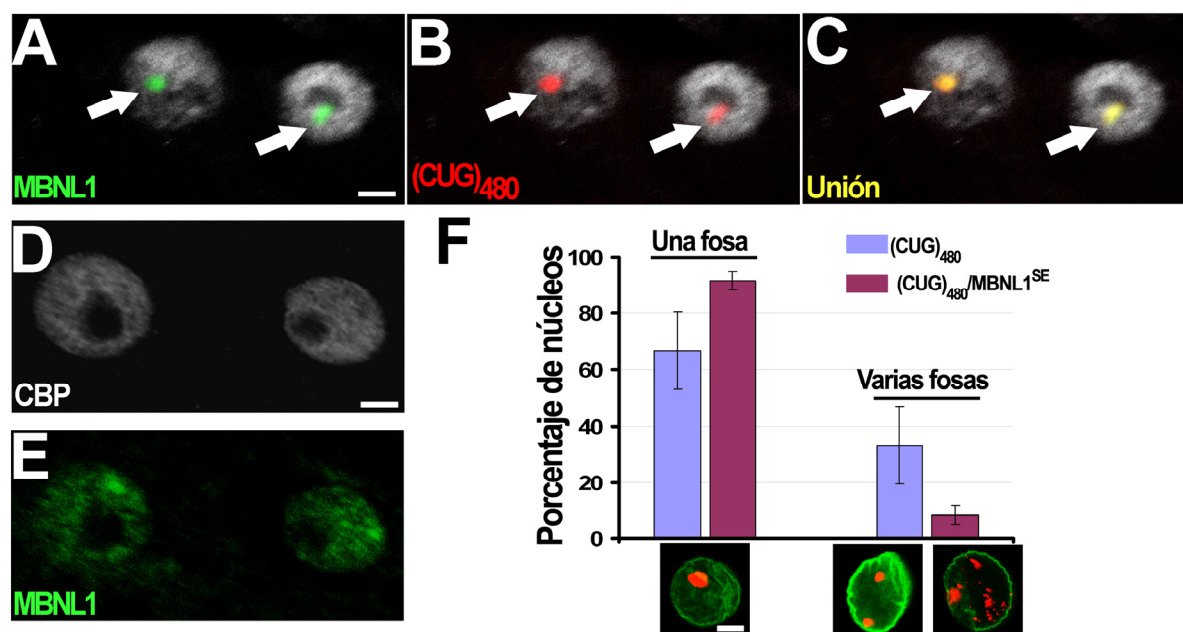


Figura 16. Co-localización de la proteína MBNL1 con las fosas nucleares de CUGs. (A-C) Imágenes de microscopía confocal de núcleos de músculo somático de larvas que co-expresan MBNL1 y (CUG)₄₈₀ tras inmunofluorescencia e hibridación *in situ*. La proteína MBNL1 se detecta al realizar una tinción con un anticuerpo contra la secuencia señalizadora que tiene el constructo de MBNL1 (en verde, flechas en A). Las fosas nucleares que contienen los transcritos de (CUG)₄₈₀ también se ven al realizar hibridación *in situ* (en rojo, flechas en B). MBNL1 y el ARN de (CUG)₄₈₀ co-localizan cuando se juntan las dos imágenes (en amarillo, flechas en C). Se realizó una co-tinción con anticuerpo anti-CBP para visualizar el núcleo (blanco). (D-E) Imágenes de microscopía confocal de núcleos que expresan únicamente MBNL1 tras tinción por inmunofluorescencia. La señal de MBNL1 se ve en verde en E, la señal de CBP muestra el núcleo en D. (F) Comparación cuantitativa de núcleos con una o varias fosas nucleares en moscas que expresan (CUG)₄₈₀ solo o con MBNL1. Las imágenes debajo de la tabla representan el tipo de fosas nucleares encontradas. La co-expresión de MBNL1 con (CUG)₄₈₀ causa un descenso del número de núcleos con varias fosas encontrados cuando se compara con (CUG)₄₈₀ por sí mismo. Escala: 5 μ m en A-F. $p=0,006$.

5.2.4. El aumento de los niveles de CUG-BP1 empeora los fenotipos de ojo y de músculo inducidos por la expresión del triplete CUG expandido

Teniendo en cuenta que las células que expresan CUGs expandidos presentan altos niveles de CUG-BP y que esto se correlacionan con fallos en el *splicing* alternativo de algunos transcritos, se decidió probar si la sobre-expresión de la proteína humana CUG-BP1 sería capaz de modificar el fenotipo inducido por la expresión de la inserción (CUG)₄₈₀. Las moscas que co-expresan CUG-BP1 y (CUG)₄₈₀ presentan un fenotipo de ojo más fuerte con mayor desorganización de los omatidios cuando se compara con moscas que solo expresan (CUG)₄₈₀ (Figura 17, A-B). Las moscas que expresan solo CUG-BP1 presentan un fenotipo débil de pérdida de quetas entre omatidios, donde apenas hay desorganización de los omatidios (Figura 17-C). Por tanto se puede concluir que la sobre-expresión de CUG-BP1 empeora el fenotipo de ojo inducido por (CUG)₄₈₀.

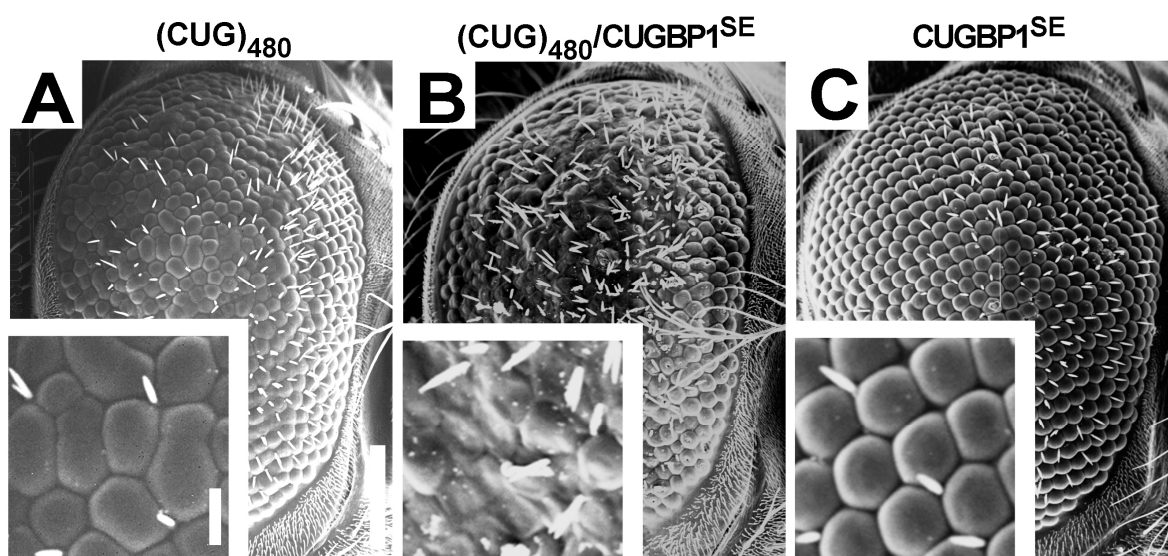


Figura 17. La sobre-expresión de CUG-BP1 potencia el fenotipo de ojo producido por (CUG)₄₈₀. Imágenes de MEB de ojos que expresan (CUG)₄₈₀, (CUG)₄₈₀ y CUG-BP1 o CUG-BP1 por sí sola. El fenotipo de (CUG)₄₈₀ (A) es potenciado por la sobre-expresión de CUG-BP1 (B). La expresión de CUG-BP1 por sí sola en el ojo tiene un fenotipo débil de pérdida de quetas entre los omatidios, pero apenas presenta desorganización de omatidios (C). Escala: 100 μ m (10 μ m en los recuadros con las magnificaciones). SE=sobre-expresión.

Cuando se sobre-expresa CUG-BP1 en el músculo somático de *Drosophila* con el *driver* MHC-GAL4, se observa un fenotipo de degeneración similar al que causa la expresión de (CUG)₄₈₀, con vacuolización y pérdida de integridad muscular. La co-expresión de CUG-BP1 y (CUG)₄₈₀ causa un empeoramiento en la

degeneración muscular (Figura 18-B, E) ya que el fenotipo que se observa es más fuerte que el producido solo por (CUG)₄₈₀ (Figura 18-A, D) o por CUG-BP1 (Figura 18-C, F).

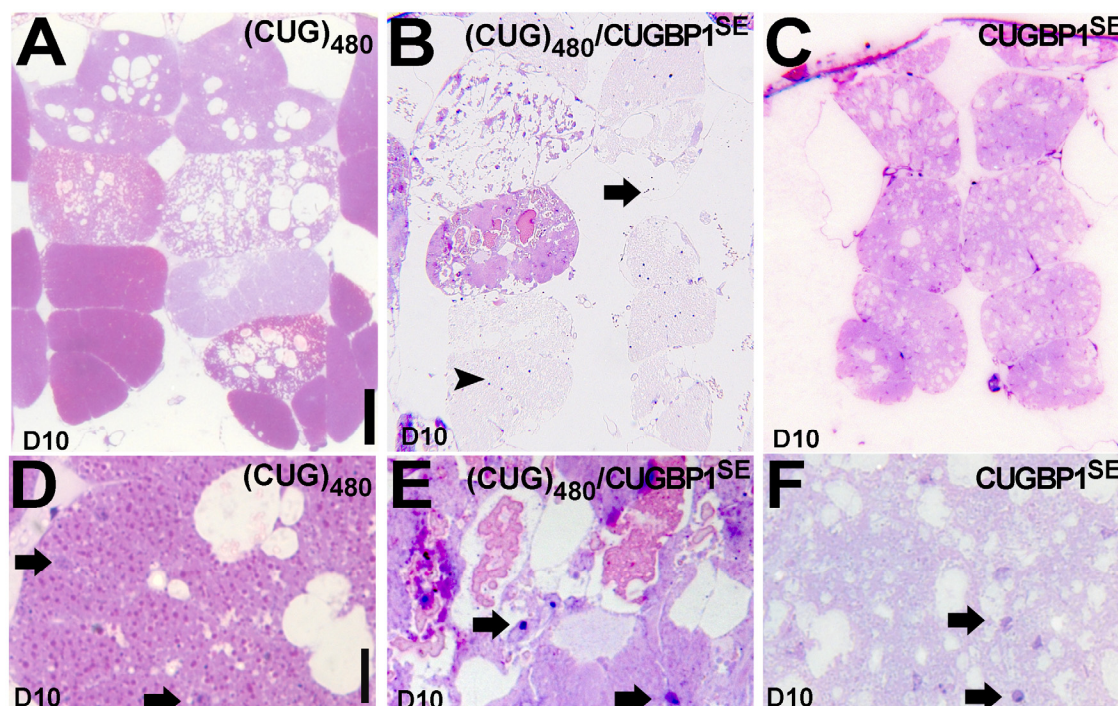


Figura 18. La sobre-expresión de CUG-BP1 potencia el fenotipo de degeneración muscular inducido por (CUG)₄₈₀. Secciones transversales semifinas de MVI adultos que expresan (CUG)₄₈₀, (CUG)₄₈₀ y CUG-BP1 o solo CUG-BP1. Moscas de 10 días de edad que expresan (CUG)₄₈₀ presentan vacuolización del tejido (A) y pérdida de la estructura de las fibras musculares (D, las flechas señalan núcleos). La co-expresión de (CUG)₄₈₀ y CUG-BP1 causa una mayor pérdida muscular en moscas de la misma edad. Algunos músculos han desaparecido (flecha) y las miofibras quedan distribuidas laxamente dentro del tejido (puntas de flecha) (B). El análisis a mayor aumento muestra una pérdida dramática de la estructura del músculo (las flechas señalan núcleos en E). La expresión de CUG-BP1 por sí misma causa un fenotipo similar al de las moscas (CUG)₄₈₀ que se muestran en A con vacuolización (C) y desorganización de fibras (las flechas señalan núcleos en F). Escala: 50 μ m en A-C, 10 μ m en D-F. SE=sobre-expresión.

Por otro lado, hasta la fecha no ha sido descrito que CUG-BP1 co-localice con las fosas nucleares de CUGs expandidos. Decidimos analizar la distribución de CUG-BP1 en músculos de larvas que co-expresan CUG-BP1 y (CUG)₄₈₀. De acuerdo con estudios anteriores, se observó que CUG-BP1 se encuentra en el núcleo de las células, pero no está secuestrado en las fosas nucleares de (CUG)₄₈₀ (Figura 19-B).

Sin embargo, la sobre-expresión de CUG-BP1 tiene un efecto en el número total de fosas nucleares que se observan, ya que causa un aumento en el número medio de estas por núcleo (Figura 19-C).

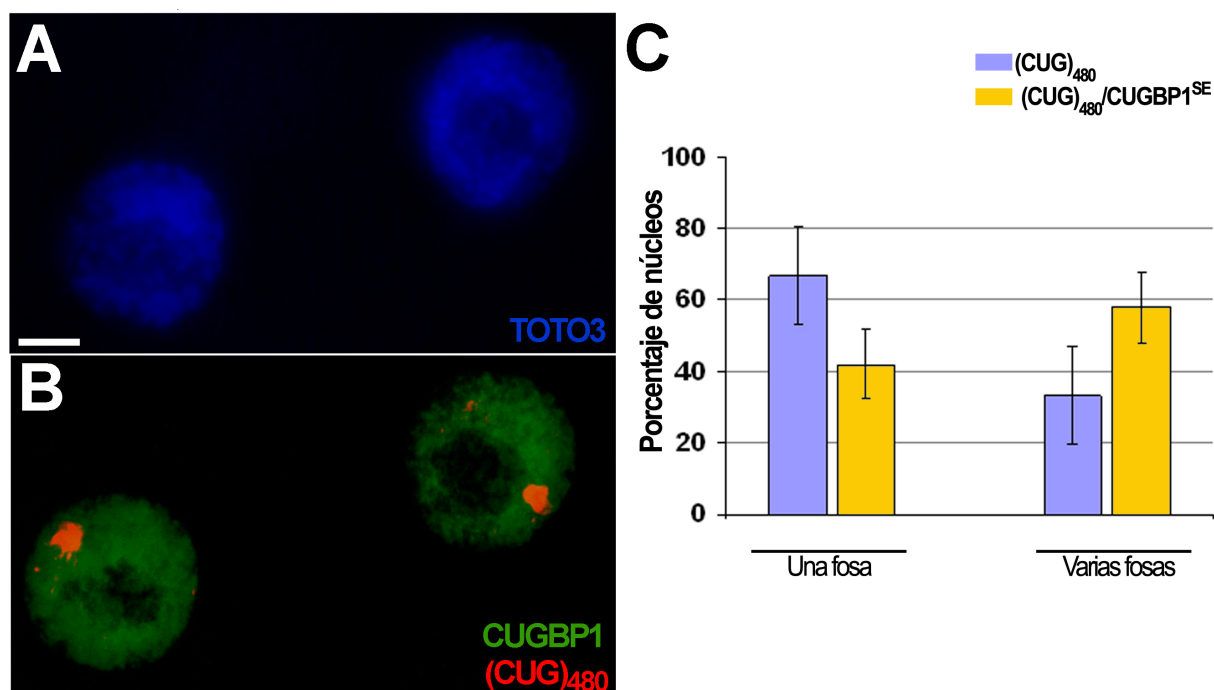


Figura 19. CUG-BP1 no se acumula en las fosas nucleares pero es capaz de modificar su distribución. (A-B) Imágenes de núcleos de músculos somáticos de larva que co-expresan (CUG)₄₈₀ y CUG-BP1 tras inmunofluorescencia e hibridación *in situ*. Los músculos se tiñeron con TOTO3 para visualizar el núcleo (azul en A). CUG-BP1 está distribuido en el núcleo (en verde en B), pero no se acumula en las fosas nucleares de (CUG)₄₈₀ (en rojo en B). **(C)** Comparación cuantitativa de núcleos con una o varias fosas nucleares en moscas que expresan (CUG)₄₈₀ solo o con CUG-BP1. En larvas que co-expresan (CUG)₄₈₀ y CUG-BP1, la media de núcleos con varias fosas nucleares es mayor que en los que solo expresan (CUG)₄₈₀. Escala: 5 μ m en A-B. $p=0,006$.

5.3. Análisis del *splicing* alternativo en el modelo de DM1 en *Drosophila*

De acuerdo con el modelo de ganancia de función del ARN, el ARN con CUGs expandidos queda secuestrado en el núcleo celular donde interfiere con proteínas de unión a ARN y altera la función de estas en el *splicing* alternativo de sus genes diana. Como se mencionó en el apartado de la introducción, en la DM1 se han descrito fallos en el *splicing* alternativo de varios genes. En todos los casos la regulación del *splicing* durante el desarrollo queda alterada, lo cual resulta en un aumento de la expresión de isoformas embrionarias en el tejido adulto.

Los genes ortólogos en *Drosophila* de los genes afectados en pacientes con DM1 son: el gen *CG31116* para el *ClC-1*, el gen del receptor parecido a la Insulina (*InR*) para el *IR*, la *troponina T (up)* para *cTNT*, la *miotubularina* para *MTMR1*, el *receptor de Rianodina 44F (Rya-r44F)* para el *RyR1*, la *ATPasa del Calcio en la posición 60A (Ca-P60A)* para la *SERCA*, el *receptor de NMDA 1 (Nmadr1)* para el *NMDAR1*, la proteína parecida al precursor del amiloide β (*Appl*) para *APP* y *tau* para la *MAPT*. Entre estos genes de *Drosophila* se conoce el *splicing* alternativo de *CG31116*, *up* y *Rya-r44F* (<http://flybase.org>).

El canal de cloro de *Drosophila* (*CG31116*) tiene 16 exones que generan 3 isoformas (A, C y D) mediante *splicing* alternativo. *CG31116-A* incluye los exones 1 al 15. La isoforma *CG31116-C* es como la A, pero excluye los exones 2 al 5. La isoforma *CG31116-D* incluye los exones 1 al 16, pero excluye el exón 15 (Figura 20). Con primers que flanquean los exones 2 al 5 y primers flanqueando los exones 15 y 16 se pueden detectar cambios en los niveles de las distintas isoformas.

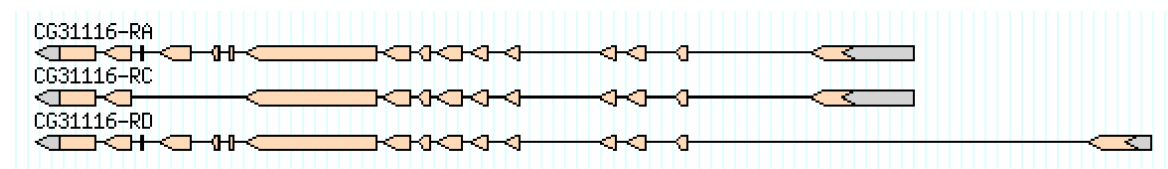


Figura 20. Estructura de los ARNm del canal de cloro (*CG31116*). Se muestra la organización de los exones e intrones de las 3 isoformas de ARNm de *CG31116*. (<http://flybase.org>)

La *troponina T (up)* tiene 14 exones que producen 6 isoformas distintas: A, B, D, E, F y G. Los exones del 5 al 10, que tienen solo de 20 a 50 pares de bases, sufren *splicing* alternativo característico entre las distintas isoformas. Se usaron primers en los exones 4 y 11 para amplificar la secuencia entre ellos. Al ser todos los productos de la RT-PCR pequeños, se amplifican todos a niveles parecidos. Se comparan los productos obtenidos de las moscas control y las moscas que expresan (CUG)₄₈₀ por tamaño y por análisis de las secuencias obtenidas.

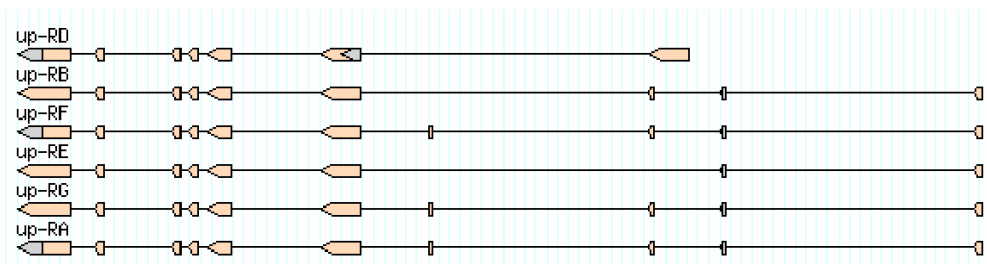


Figura 21. Estructura de los ARNm de la Troponina T (*up*). Se muestra la organización de los exones e intrones de las 6 isoformas de *up*. (<http://flybase.org>)

El receptor de Rianodina en *Drosophila* (*Rya-r44F*) tiene 29 exones. La inclusión o exclusión de los exones 27 y 28 da como resultado 4 isoformas: A, B, C y D. Ambos exones están excluidos en la isoforma B e incluidos en la C. La isoforma A incluye el exón 28 pero no el 27, y la isoforma D incluye el 27 y no el 28 (Figura 22). Para detectar cambios entre las distintas isoformas se diseñaron primers entre los exones 12 y 15, que flanquean al exón 28 y con los que se detectarán diferencias entre las isoformas A-C y B-D.

Los demás genes de *Drosophila* ortólogos de los genes humanos que sufren alteraciones en el *splicing* alternativo en la DM1 (*InR*, *miotubularina*, *Nmdar1*, *Appl*, *tau* y *Ca-P60A*) no sufren *splicing* alternativo de acuerdo con la versión actual de la base de datos de exones de *Drosophila* (<http://flybase.org>).

La estructura de exones e intrones en los genes ortólogos de los genes afectados en la DM1 en *Drosophila* no está conservada. Por esta razón, además de los ortólogos, también investigamos otros genes con el objetivo de encontrar nuevos genes implicados en la patología de la DM1. Dos grupos de genes fueron elegidos. El primer grupo contiene genes cuyo *splicing* cambia durante el proceso de diferenciación del músculo en ratón o en pollo. Para el segundo grupo se escogieron genes al azar en el genoma de *Drosophila* que cumpliesen dos requisitos: sufriesen *splicing* alternativo y se expresaran en el músculo (Tabla 4).

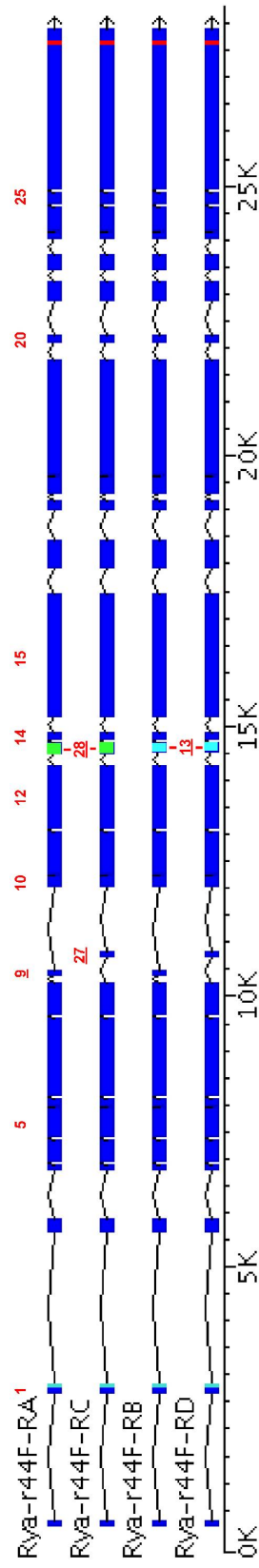


Figura 22. Estructura de los exones e intrones de los ARNm del gen del Receptor de Rianodina. El *splicing* alternativo del gen *Rya* produce 4 isoformas distintas dependiendo del *splicing* de los exones 9, 27, 13 y 28. El exon 28 (en verde) es una isoforma larga del exon 13 (en azul claro). Las líneas azules claras en el exón 1 indican la señal de iniciación, las líneas rojas en el exón 26 indican la situación de la señal de terminación. (Imagen modificada de www.flybase.org)

	<u>Gen en <i>Drosophila</i></u>	<u>Gen en humanos</u>
Genes afectados en la DM1	<i>Up</i> <i>CG31116</i> <i>Appl</i> <i>Nmdar 1</i> <i>Rya-r44F</i> <i>CG30084</i>	<i>cTNT</i> <i>CIC-1</i> <i>APP</i> <i>NMDAR1</i> <i>RyR</i> <i>ZASP (Z-band alternatively spliced PDZ-domain protein)</i>
Genes que sufren cambios en el <i>splicing</i> durante la diferenciación del músculo	<i>Mlf</i> <i>bent (bt)</i> <i>Caki</i> <i>CG7766</i> <i>Pkc53E</i> <i>Cpx</i> <i>CLIP190</i> <i>Mef2</i>	<i>MLF (myeloid leukemia factor 1)</i> <i>MYOM (myomesin)</i> <i>CASK (calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase)</i> <i>PHKA (phosphorilase kinase, α1)</i> <i>PRKA (protein kinase C, α)</i> <i>CPLX1 (complexin 1)</i> <i>RSN (restin)</i> <i>MEF2 (myocyte enhancer factor 2)</i>
Genes de <i>Drosophila</i> que sufren <i>splicing</i> y que se expresan en músculo	<i>CG1031 (α-esterase-1)</i> <i>C3G</i> <i>CG1021</i> <i>CG2246</i> <i>CG6803 (zeelin/myofilin)</i> <i>CG8176</i> <i>CG9238</i> <i>CG9611</i> <i>hth (homothorax)</i> <i>ps (pasilla)</i> <i>Pep (protein on ecdysone puffs)</i> <i>α-actinin</i>	<i>ACHE (acetylcholinesterase isoform E4-E5 precursor)</i> <i>RAPGEF1 (Rap guanine nucleotide exchange factor)</i> <i>TMCC2 (transmembrane and coiled-coil domain family 2)</i> <i>PRPSAP2 (phosphoribosyl pyrophosphate)</i> No existe homología con otras especies <i>SGIP1 (Hypothetical protein DKFZp686A16142)</i> <i>PPP1R3C (protein phosphatase 1)</i> <i>LRRC40 (leucine rich repeat containing 40)</i> <i>homeobox gene MEIS1</i> <i>NOVA1 (Neuro-oncological ventral antigen 1)</i> <i>CIZ1 (Cip1-interacting zinc finger protein)</i> <i>ACTN2</i>

Tabla 4. Lista de genes en los que se analizaron posibles fallos en *splicing* alternativo tras la expresión de (CUG)₄₈₀. Lista detallada de los 3 grupos de genes elegidos para analizar su *splicing* alternativo con sus correspondientes ortólogos en humanos (en caso de existir).

De todos los genes analizados encontramos diferencias entre el *splicing* en moscas control y en moscas que expresan (CUG)₄₈₀ de dos genes: el gen que codifica para el receptor de Rianodina en *Drosophila*, *Rya-r44F* y el gen *CG6803*.

5.3.1. El patrón de *splicing* del gen que codifica para el Receptor de Rianodina en *Drosophila* está alterado en nuestro modelo de DM1

El gen *RyR1* es uno de los últimos en los que han sido descritos cambios en su *splicing* en pacientes con DM1. Las células de mamíferos tienen 3 genes que codifican para Receptores de Rianodina: *RyR1* en el músculo esquelético, *RyR2* en

músculo cardíaco y RyR3 en el cerebro. En *Drosophila*, solo ha sido identificado un gen que codifica para el Receptor de Rianodina con 5134 amino ácidos y que comparte un 45% de identidad con los miembros de la familia de mamíferos. Durante la embriogénesis, el *Ryanodine receptor 44F (Rya-r)* se expresa en los músculos del cuerpo, viscerales y de la cabeza así como en otros tejidos como el sistema nerviosa central. En adultos también se expresa en los músculos y en el cerebro (Sullivan, Scott et al. 2000).

El gen *Rya-r* está compuesto por 26 exones. El *splicing* del exon 13 puede dar lugar a una forma corta y a una larga. Existen 4 isoformas del *Rya-r*, las isoformas B y D contienen la forma corta del exón 13 mientras que las isoformas A y C contienen la larga (o exón 28) (Figuras 22 y 23). Se diseñaron primers en los exones 12 y 15 y se realizó RT-PCR sobre ARNs de tórax de adultos a día 1, 5 y 10.

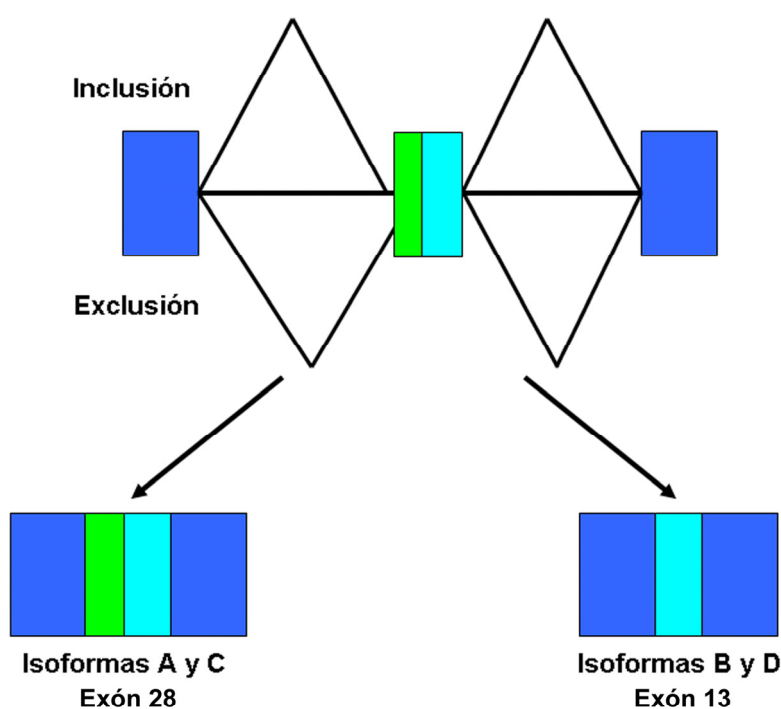


Figura 23. Análisis del *splicing* alternativo de los exones 13 y 28 del ARNm de *Rya-r44F*. La inclusión del fragmento genómico detallado en verde en la figura, de 42 pares de bases genera las isoformas A y C con el exón 28, mientras que su exclusión genera las isoformas más cortas B y D con el exón 13 que quedarán representadas más abajo en un gel de acrilamida tras realizar amplificación del ARNm mediante RT-PCR.

Como se ve en la figura 24, a día 1 las isoformas mayoritarias son B y D, y a día 5 se observa un aumento en la cantidad de transcritos que contienen las isoformas A y C aunque sigan siendo mayoritarias la B y D. También a día 10 las isoformas mayoritarias son las B y D. En las moscas que expresan (CUG)₄₈₀ no se observan diferencias en los días 1 y 5. Es a día 10 cuando se detecta un cambio en el *splicing* y se ve que a diferencia de las moscas control, que presentan mayoritariamente una banda correspondiente a las isoformas B y D, en las moscas que expresan (CUG)₄₈₀ aparecen dos bandas casi de la misma intensidad. Esto supone un gran aumento de la cantidad de isoformas A y C presente en estas moscas.

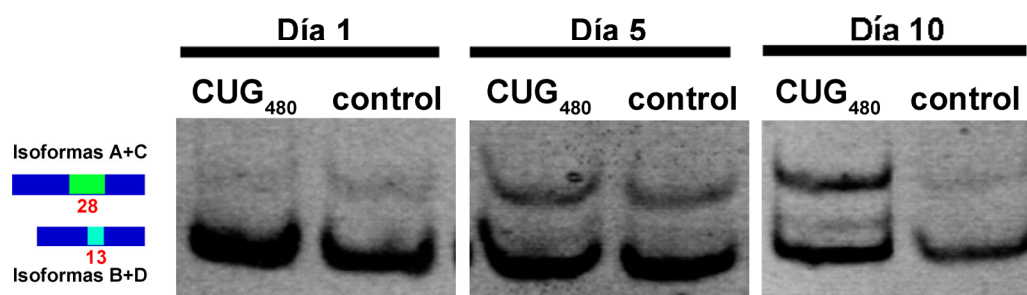


Figura 24. Las moscas (CUG)₄₈₀ presentan alteraciones en el *splicing* alternativo de los exones 13 y 28 del gen del Receptor de Rianodina. Los geles de acrilamida muestran bandas de dos tamaños distintos dependiendo de la inclusión o exclusión de un fragmento de 42 pares de bases que diferencia al exón 28 del 13 tras realizar RT-PCR con primers en los exones 12 y 14 sobre el ARN extraído de tórax de moscas control o moscas que expresan (CUG)₄₈₀ a día 1, 5 o 10. Las diferencias solo son notables a día 10.

5.3.2. El patrón de *splicing* del gen *CG6803* está alterado en nuestro modelo de *DMI*

Se encontraron cambios en el patrón de *splicing* alternativo cuando se expresa (CTG)₄₈₀ en el gen *CG6803* (*Zeelin1/Myofilin*). La Miofilina, junto con Flightin, forma parte de los filamentos gruesos de Miosina en los MVI de *Drosophila*. De acuerdo con un estudio reciente, la Miofilina se encuentra por dentro de los filamentos gruesos de Miosina y es importante para su ensamblaje. Flightin, que se encuentra por fuera de estos filamentos, los estabiliza tras el ensamblaje (Qiu, Brendel et al. 2005). Existen 5 transcritos diferentes de la Miofilina que se generan por *splicing* alternativo. El gen de la Miofilina se encuentra en la posición cromosómica 3R 88E2. Tiene 9

exones; el codon de iniciación está en el exón 2 y hay codones de terminación en los exones 5, 8 y 9. Los exones 4, 5 y 6 contienen señales de *splicing* internas, por lo que las distintas isoformas contienen versiones cortas o largas de estos exones (Figura 25). En los músculos del tórax de la mosca se encuentran las 5 isoformas, pero la isoforma C de unos 20 kDa es la única que forma parte de los MVI. Por el contrario, en embriones y larvas solo se encuentran mediante análisis del ARN por Northern Blot una isoforma de unos 1.3 kb (los transcritos de la isoforma C tienen una longitud aproximada de 0.8 kb) (Qiu, Brendel et al. 2005).

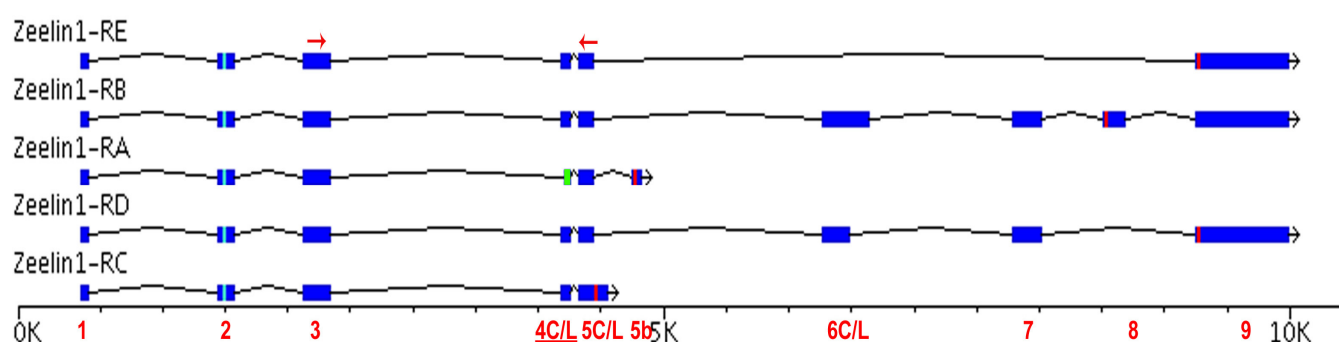


Figura 25. Estructura de los exones e intrones de los ARNm del gen de la Miofilina. El *splicing* alternativo genera 5 isoformas del gen de la Miofilina/*Zeelin1*. En la parte de abajo se detalla el nombre de los exones en rojo (C=corto, L=largo), los tamaños son como sigue: exón 1=62pb, 2=141pb, 3=209pb, 4C=48pb, 4L=69pb, 5C=109pb, 5L=226pb, 5b=61pb, 6C=206pb, 6L=362pb, 7=230pb, 8=170pb, 9=749pb. El exón 4C para el cual se diseñaron los primers en el experimento se ve en verde, la localización de los primers diseñados se muestra en la parte de arriba de la figura en forma de flechas rojas. Las líneas azules claras en el exón 2 indican la señal de iniciación, las líneas rojas en los exones 5L, 5b, 8 y 9 indican la situación de las señales de terminación. pb=pares de bases. (Imagen modificada de www.flybase.org)

Cuando generamos primers para analizar el *splicing* alternativo de la Miofilina en nuestro modelo de DM1, detectamos un cambio en el patrón de *splicing* alternativo en las moscas que expresan (CTG)₄₈₀ en el músculo adulto en comparación con moscas control. Las moscas control presentan mayor porcentaje de lo que debería ser la isoforma *Zeelin 1-A* ya que excluye la variante larga del exón 4 controlada por señales internas de *splicing*. Las moscas que expresan (CTG)₄₈₀ presentan un cambio en el *splicing* de este exón e inclusión de la forma larga del exón 4, lo cual significa una reducción de la cantidad de la isoforma *Zeelin1-A*. Este cambio no se observa en larvas, donde tanto controles como moscas con DM1 presentan solo la isoforma larga (Figura 27). Esto supone una reversión en los adultos (CUG)₄₈₀ a la isoforma larvaria,

lo cual recuerda a lo que ocurre en pacientes con DM1 donde los fallos en el *splicing* alternativo producen la expresión aberrante de isoformas fetales en adultos.

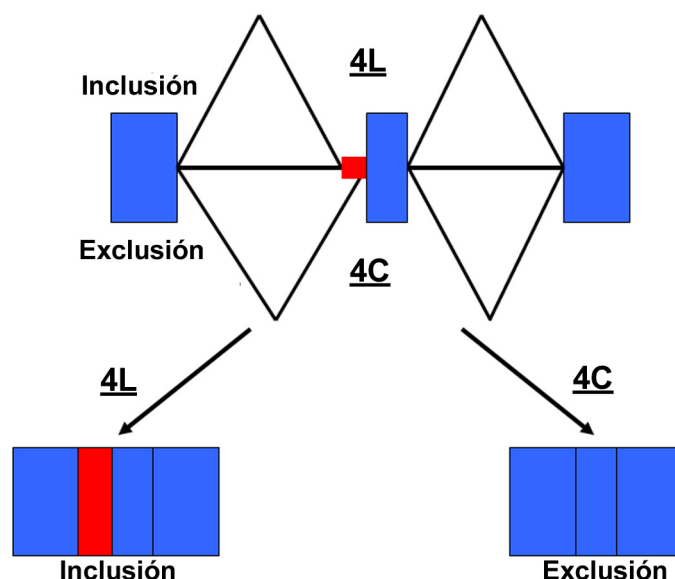


Figura 26: Análisis del *splicing* alternativo del exón 4 del ARNm de *CG6803* (*Miofilina/Zee1in1*). La inclusión del fragmento genómico detallado en rojo en la figura de 20 pares de bases genera isoformas con el exón 4L, mientras que su exclusión generará formas más cortas 4C que quedarán representadas más abajo en un gel de acrilamida tras realizar amplificación del ARNm mediante RT-PCR.

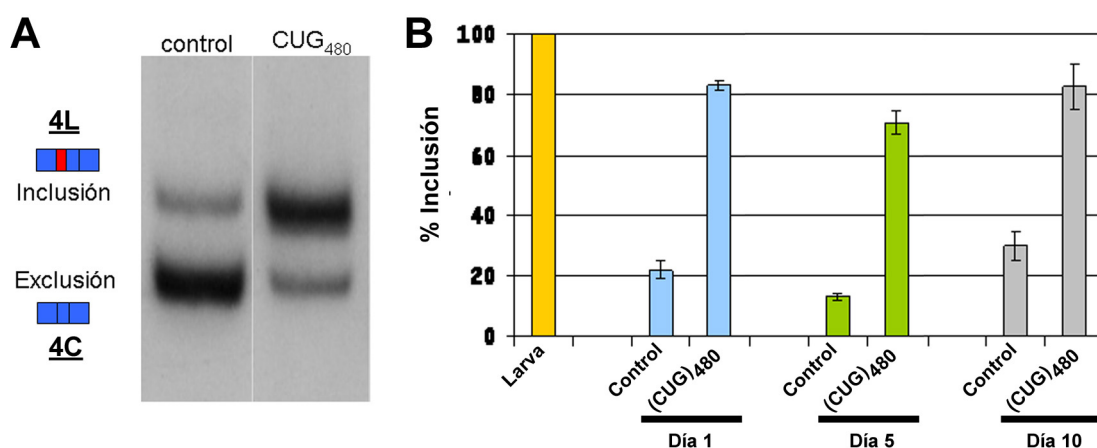


Figura 27. Las moscas (CUG)₄₈₀ presentan alteraciones en el *splicing* alternativo del exón 4 del gen de la *Miofilina/Zee1in1*. (A) Los geles de acrilamida muestran bandas de dos tamaños distintos obtenidas tras realizar RT-PCR, con primers dentro de la secuencia del gen *Miofolina/Zee1in1*, sobre el ARN extraído de tórax de moscas control o moscas que expresan (CUG)₄₈₀. En las moscas control se observa una mayor cantidad de RNA con exclusión, mientras que en las moscas que expresan (CUG)₄₈₀ la situación es contraria y la mayor parte del ARN amplificado incluye el exón largo. (B) Porcentaje de inclusión tras medir la intensidad de las bandas obtenidas en los geles de acrilamida con un espectrofotómetro en ARNs obtenidos de larvas o moscas

adultas con o sin (Control) expresión de (CUG)₄₈₀ a día 1, 5 y 10. Las barras muestran la desviación estándar.

5.4. Identificación de nuevos genes modificadores de la toxicidad inducida por el triplete CTG expandido

Se llevaron a cabo 3 *screens* genéticos para identificar nuevos genes capaces de modificar el fenotipo inducido por la expresión de (CUG)₄₈₀, ya sea suprimiéndolo o potenciándolo.

Los *screens* se realizaron utilizando el fenotipo de degeneración del ojo producido por los (CTG)₄₈₀ como instrumento para buscar posibles modificadores. En la primera fase se cruzaron todas las líneas recopiladas con una línea generada en el laboratorio que contiene tanto la inserción con (CTG)₄₈₀ como el *driver* de ojo GMR-GAL-4. Los cruces se realizaron a 25°C, ya que la línea utilizada a esta temperatura tiene un fenotipo tal que permite detectar modificaciones tanto por supresión como por potenciación.

Tras el *screen* primario se obtuvieron una serie de genes candidatos y se desecharon los restantes. En el *screen* secundario se cruzaron de nuevo los modificadores obtenidos en el *screen* primario para desechar falsos positivos o positivos causados por la interacción de la mutación con el driver GMR-GAL-4. Una vez finalizados los *screens* primario y secundario se realizó un análisis de los genes obtenidos, se caracterizaron por función molecular y se escogieron algunos de los que pensamos que podrían ser más relevantes o cuya modificación era más fuerte, para ser caracterizados en más detalle.

AGMR-GAL4; UAS-(CTG)₄₈₀**X**

Colección de líneas con genes mutados

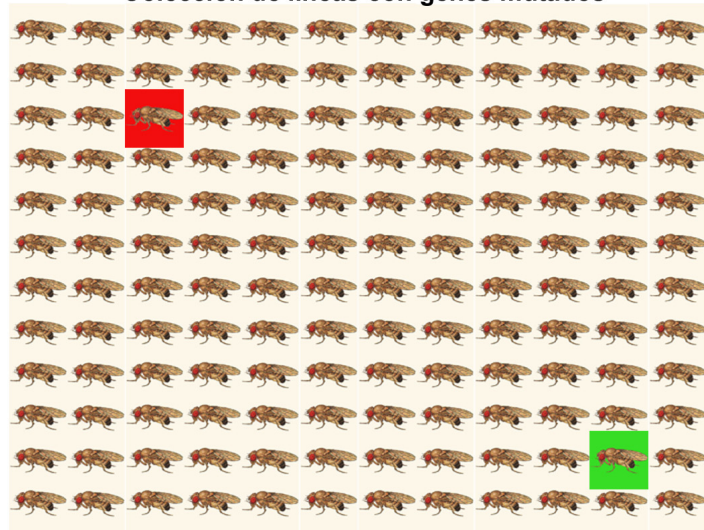
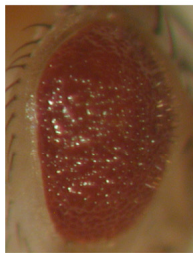
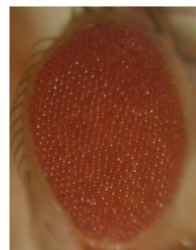
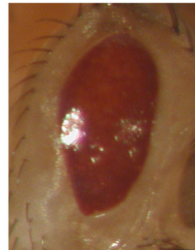
**B****Control****Potenciador****Supresor**

Figura 28. Representación esquemática de la estrategia del *screen* genético con el modelo de DM1. (A) Hembras de la línea GMR-GAL4; UAS-(CTG)₄₈₀ se cruzan con machos de las distintas colecciones de mutantes. De entre todos los cruces se obtendrán genes que modifiquen el fenotipo producido por la expresión de los CUG expandidos en el ojo tanto potenciándolo (representado en rojo en la figura), como suprimiéndolo (representado en verde). **(B)** Fotos de ojo fresco que representan ejemplos de ojos control, ojos resultantes del cruce con la mutación en un gen que potencia el fenotipo (Potenciador) y ojos resultantes del cruce con una mutación en un gen que suprime el fenotipo (Supresor).

5.4.1. *Screen* genético dirigido con proteínas de unión a ARN.

En primer lugar se realizó un *screen* dirigido para el que se recogió una colección de mutaciones en genes “candidatos” a modificar el fenotipo producido por los CUGs expandidos. Esta colección incluye los alelos disponibles tanto por falta de

función como por sobre-expresión de genes que codifican para proteínas de unión a ARN. Teniendo en cuenta que la DM1 se produce por una ganancia de función de un ARN mutante capaz de secuestrar proteínas de unión a ARN, y que MBNL1 y CUG-BP1 pertenecen a este grupo, pensamos que dentro de esta clase de proteínas tendríamos más posibilidades de encontrar modificadores. Se realizó una búsqueda en la base de datos www.flybase.org y se realizó una lista con todas las líneas disponibles con mutaciones en proteínas de unión a ARN, que a continuación se recopilamos en el laboratorio. La colección incluye 93 mutantes por falta de función y 17 líneas con sobre-expresiones. La mayoría de las líneas con sobre-expresiones provienen de inserciones de elementos P(EP) con secuencias activadoras que al ser insertadas en el genoma de la mosca al azar permiten la transcripción de un gen de manera específica de tejido con una línea GAL4 determinada (Rorth 1996). El total de genes que codifican para proteínas de unión a ARN analizados es de 73.

Gen	Stock	Modificación
<i>Adar</i> (Adenosine deaminase acting on RNA)	12727	No
<i>Aly</i>	11562	No
<i>apt</i> (apontic)	11258	No
<i>Atx2</i> (Ataxin-2)	EP3175	Si
<i>Atx2</i> (Ataxin-2)	11688	Si
<i>BicC</i> (Bicaudal C)	3247	No
<i>BicC</i> (Bicaudal C)	2989	No
<i>BicD</i> (Bicaudal D)	4553	No
<i>BicD</i> (Bicaudal D)	3244	No
<i>BicD</i> (Bicaudal D)	2988	No
<i>bl</i> (banca)	10691	Si
<i>bl</i> (banca)	14582	Si
<i>bol</i> (boule)	EP584	Si
<i>bol</i> (boule)	11794	Si
<i>B52</i>	10265	No
<i>CG3249</i>	EP1400	No
<i>CG3249</i>	12879	No
<i>caz</i> (cabeza)	EP1564	No
<i>cpo</i> (couch potato)	11531	No
<i>dsx</i> (doublesex)	2445	No
<i>dsx</i> (doublesex)	1679	No
<i>egl</i> (egalitarian)	EP938	Si
<i>egl</i> (egalitarian)	3459	Si
<i>eIF-4a</i> (Eukaryotic initiation factor 4a)	EP397	No
<i>eIF-4a</i> (Eukaryotic initiation factor 4a)	10506	No
<i>eIF-4e</i> (Eukaryotic initiation factor 4e)	11720	No
<i>eIF-4e</i> (Eukaryotic initiation factor 4e)	EP3371	No
<i>fne</i> (found in neurons)	6897	No
<i>heph</i> (hephaestus)	11589	No
<i>hoip</i> (hoi-polloi)	10654	No
<i>how</i> (held out wings)	EP858	No

<i>how</i> (<i>held out wings</i>)	12151	No
<i>Hrb27C</i> (<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein at 27C</i>)	11204	No
<i>Hrb87F</i> (<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein at 87F</i>)	14414	No
<i>Hrb98DE</i> (<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein at 98DE</i>)	15075	No
<i>hrg</i> (<i>hiiragi</i>)	13728	No
<i>Imp</i> (<i>IGF-II mRNA-binding protein</i>)	EP760	No
<i>Imp</i> (<i>IGF-II mRNA-binding protein</i>)	EP1433	No
<i>Int6</i> (<i>Int6 homologue</i>)	11748	Si
<i>Irp-1B</i> (<i>Iron regulatory protein 1B</i>)	EP961	No
<i>Lark</i>	EP3259	No
<i>l(1)3Ag(1)</i> (<i>lethal (1) 3Ag</i>)	3903	No
<i>msi</i> (<i>musashi</i>)	4160	No
<i>msl-3</i> (<i>male-specific lethal 3</i>)	13165	No
<i>mura</i> (<i>murashka</i>)	EP1202	No
<i>mura</i> (<i>murashka</i>)	EP527	No
<i>nonA</i> (<i>no on or off transient A</i>)	125	No
<i>nos</i> (<i>nanos</i>)	12143	Si
<i>pAbp</i> (<i>polyA-binding protein</i>)	10970	Si
<i>pAbp2</i>	EP2264	No
<i>Piwi</i>	12225	No
<i>pum</i> (<i>pumilio</i>)	EP3461	No
<i>pum</i> (<i>pumilio</i>)	6782	No
<i>pUf68</i> (<i>poly U binding factor 68kD</i>)	EP3058	No
<i>qkr58E-2</i> (<i>quaking related 58E-2</i>)	14653	No
<i>qkr58E-3</i> (<i>quaking related 58E-3</i>)	15086	Si
<i>Rb97D</i> (<i>Ribonuclear protein at 97D</i>)	11782	No
<i>Rbp9</i> (<i>RNA-binding protein 9</i>)	12836	No
<i>rin</i> (<i>rasputin</i>)	EP920	No
<i>Rm62</i>	EP3607	No
<i>RnpS1</i> (<i>RNA-binding protein S1</i>)	EP527	No
<i>scaf6</i>	EP3444	No
<i>SC35</i>	12904	No
<i>Slbp</i> (<i>Stem-loop binding protein</i>)	EP3182	No
<i>smg</i> (<i>smaug</i>)	EP3556	Si
<i>smg</i> (<i>smaug</i>)	5930	Si
<i>snf</i> (<i>sans fille</i>)	4316	No
<i>snRNP70K</i> (<i>small nuclear ribonucleoprotein 70K</i>)	11177	No
<i>spen</i> (<i>split ends</i>)	10646	No
<i>sqd</i> (<i>squid</i>)	EP955	No
<i>sqd</i> (<i>squid</i>)	EP746	No
<i>stau</i> (<i>stau</i>)	10742	No
<i>stau</i> (<i>stau</i>)	3297	No
<i>stau</i> (<i>stau</i>)	1507	No
<i>Sxl</i> (<i>sex lethal</i>)	3719	No
<i>Sxl</i> (<i>sex lethal</i>)	1414	No
<i>TBPH</i>	14737	No
<i>tra2</i> (<i>transformer 2</i>)	14718	No
<i>tra2</i> (<i>transformer 2</i>)	EP1173	No
<i>tsu</i> (<i>tsunagi</i>)	6597	No
<i>U2A</i>	4127	No
<i>U2af38</i> (<i>U2 small nuclear riboprotein auxiliary factor 38</i>)	12323	No
<i>U2af38</i> (<i>U2 small nuclear riboprotein auxiliary factor 38</i>)	10448	No
<i>vig</i> (<i>vasa intronic gene</i>)	EP812	No
<i>yps</i> (<i>epsilon schachtel</i>)	EP3078	No
<i>ytr</i> (<i>yantar</i>)	12328	Si

<i>ytr</i> (yantar)	EP2136	Si
Zn72D	12863	No

Tabla 5. Lista de genes utilizados en el screen de proteínas de unión de ARN. La tabla muestra los genes utilizados en el screen con proteínas de unión a ARN en *Drosophila*, las líneas obtenidas de los stock centers y si tienen algún efecto en el modelo de DM1.

<u>Gen</u>	<u>Stock</u>	<u>Alelo</u>	<u>Tipo de alelo</u>	<u>Modificación</u>
<i>Atx2</i> (Ataxin-2)	EP3175	EP3175	EP-SE	Potenciador
<i>Atx2</i> (Ataxin-2)	11688	<i>Atx2</i> ⁰⁶⁴⁹⁰	P-FDF	Supresión
<i>Atx2</i> (Ataxin-2)	UAS-Atx2	UAS-Atx2	UAS-SE	Potenciador
<i>Atx2</i> (Ataxin-2)	<i>Atx2</i> ^{X1}	<i>Atx2</i> ^{X1}	D-FDF	Supresión
<i>bl</i> (bancal)	20053	P{EPgy2} <i>bl</i> ^{EY09813}	EP-SE	No
<i>bl</i> (bancal)	14587	<i>bl</i> ^{KG02524}	P-FDF	Potenciador
<i>bol</i> (boule)	EP584	EP584	EP-FDF	No
<i>bol</i> (boule)	11794	<i>bol</i> ¹	P-FDF	Supresión
<i>bol</i> (boule)	17591	P{EPgy2} <i>bol</i> ^{EY09688}	EP-SE	Potenciador
<i>bol</i> (boule)	EP3326	EP3326	EP-SE	Potenciador
<i>bol</i> (boule)	EP3659	EP3659	EP-SE	Potenciador
<i>egl</i> (egalitarian)	EP938	EP938	EP-SE	Potenciador
<i>egl</i> (egalitarian)	16415	P{EPgy2} <i>egl</i> ^{EY07652}	EP-SE	Potenciador
<i>Int6</i> (Int6 homologue)	11748	<i>Int6</i> ¹⁰⁵⁴⁷	P-FDF	Potenciador
<i>nos</i> (nanos)	12143	<i>nos</i> ^{i3B6}	P-FDF	Potenciador
<i>nos</i> (nanos)	20114	P{EPgy2} <i>nos</i> ^{EY01331}	EP-SE	Supresión
<i>pAbp</i> (polyA-binding protein)	17261	EP310	EP-FDF	Potenciador
<i>pAbp</i> (polyA-binding protein)	20684	P{EPgy2} <i>pAbp</i> ^{EY11561}	EP-SE	Potenciador
<i>pAbp</i> (polyA-binding protein)	10970	<i>pAbp</i> ^{k10109}	P-FDF	Potenciador
<i>pAbp</i> (polyA-binding protein)	UAS-hpAbp	UAS-hpAbp	UAS-SE	Potenciador
<i>qkr58E-3</i> (quaking related 58E-3)	15086	P{EPgy2} <i>qkr58E-3</i> ^{EY02038}	EP-SE	Potenciador
<i>qkr58E-3</i> (quaking related 58E-3)	EP2493	EP2493	EP-SE	Potenciador
<i>smg</i> (smaug)	EP3556	EP3556	EP-SE	Supresión
<i>smg</i> (smaug)	19493	<i>smg</i> ^{PL00423}	P-FDF	Potenciador
<i>smg</i> (smaug)	5930	<i>smg</i> ¹	EMS-FDF	Potenciador
<i>ytr</i> (yantar)	12328	<i>ytr</i> ^{k13108}	P-FDF	Potenciador
<i>ytr</i> (yantar)	EP2136	EP2136	EP-FDF	Potenciador
<i>ytr</i> (yantar)	12197	<i>ytr</i> ^{k13214}	P-FDF	Potenciador
<i>ytr</i> (yantar)	20058	P{EPgy2} <i>ytr</i> ^{EY10003}	EP-FDF	Potenciador

Tabla 6. Genes que codifican para proteínas de unión a ARN capaces de modificar el fenotipo inducido por (CTG)₄₈₀. En la tabla se muestran los genes que modifican el fenotipo de nuestro modelo de DM1 con sus correspondiente stock, nombre y tipo de alelo utilizado y modificación obtenida. (P= elemento P, EP= enhancer P element, D= deleción, UAS= línea de sobre-expresión UAS, EMS= mutación producida por etilmetilsulfonato, Rγ= mutación producida por rayos γ, FDF= falta de función, SE= sobre-expresión).

El mejor modificador identificado en el *screen* realizado con proteínas de unión a ARN resultó ser la Ataxina 2 (Atx2). Como se ve en la tabla 6, alelos independientes de la Ataxina 2 tanto por falta de función como por sobre-expresión son capaces de modificar el fenotipo de ojo inducido por la expresión de (CUG)₄₈₀. La falta de función de Atx2 suprime drásticamente en fenotipo de ojo. Las moscas que expresan (CUG)₄₈₀ en un fondo heterocigótico para una mutación de falta de función de Atx2 presentan un ojo bien organizado en comparación con moscas que expresan solo (CUG)₄₈₀ (Figura 29-B). Por otro lado la sobre-expresión, mediante una construcción con UAS-Atx2 (Satterfield, Jackson et al. 2002), lo potencia aumentando el fenotipo de desorganización de los omatidios y disminuyendo el tamaño del ojo (Figura 29-C).

Debido a estos resultados en el ojo, se estudió si también se daba supresión del fenotipo que se ve en músculos adultos. Se examinó la degeneración muscular en moscas a día 20 que expresaban (CUG)₄₈₀ en el fondo heterocigótico para la mutación de falta de función de Atx2 y se las comparó con las que solo expresaban (CUG)₄₈₀. Como se ve en la figura 29, D-E encontramos que la falta de función de Atx2 es capaz de suprimir la toxicidad inducida por la expansión de CUGs en el músculo adulto.

Como se puede ver en la tabla 6, aparte de la Ataxina 2 en nuestro *screen* con proteínas de unión a ARN hemos identificado otros modificadores del fenotipo de ojo inducido por la expresión de (CUG)₄₈₀. EPs que sobre-expresan los genes *boule* (Figura 30, E-G), *egalitarian* (Figura 31, C-D) y *quaking related 58E-3* (Figura 32, C-D) potencian el fenotipo. En el caso del gen *boule*, no solo hemos podido observar potenciación por sobre-expresión sino que una mutación por falta de función es capaz de suprimir el fenotipo de ojo (Figura 30-D). Por otro lado, en el caso de los genes *bancal* (Figura 33-D), *Int6 homologue* (Figura 34-C), *nanos* (Figura 35-D), *smaug* (Figura 36, D-E) y *yantar* (Figura 37, C-F) son las mutaciones de falta de función las que potencian el fenotipo. En el caso de *nanos* (Figura 35-C) y *smaug* (Figura 36-C) también detectamos supresión por sobre-expresión. Finalmente, las mutaciones en el gen *pAbp* potencian el fenotipo de (CUG)₄₈₀ tanto por sobre-expresión (Figura 38, E-

F) como por falta de función (Figura 38, C-D) lo cual indica que la alteración de sus niveles es clave tanto cuando se disminuyen como cuando se aumentan.

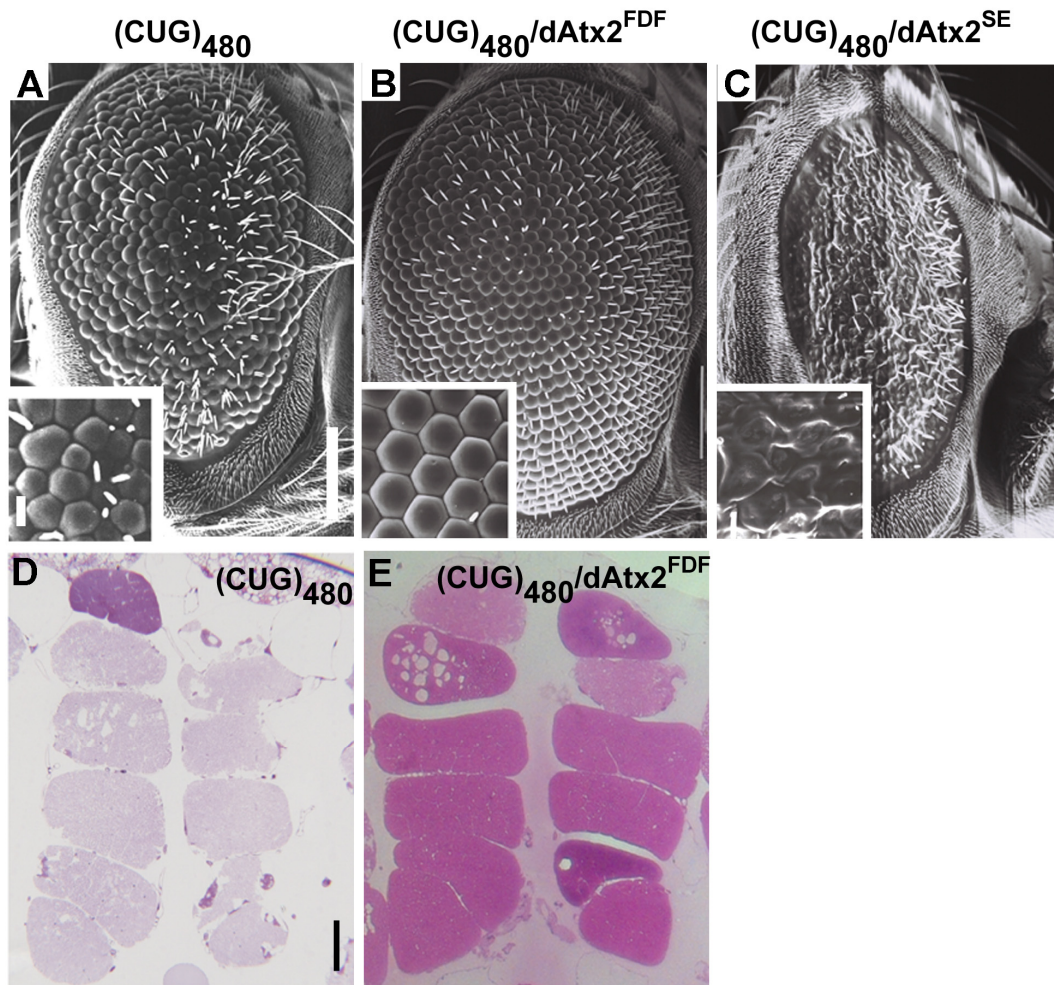


Figura 29. La Ataxina 2 suprime el fenotipo inducido por la expresión del triplete CTG expandido. (A-C) Imágenes de MEB de la estructura de ojos que expresan solo (CUG)₄₈₀, con una mutación en heterocigosis en *Atx2* o junto con UAS-*Atx2*. El fenotipo de (CUG)₄₈₀ (A), es suprimido por la falta de función de *Atx2* (B). La sobre-expresión de *Atx2* mediante un UAS potencia el fenotipo (C). (D-E) Secciones transversales de resina de MVI de adultos que expresan solo (CUG)₄₈₀ o con una mutación de falta de función en heterocigosis de *Atx2*. A día 20, las moscas que expresan (CUG)₄₈₀ muestran un bajo número de fibras por músculo así como degeneración total de algunos músculos (D). Este fenotipo es rescatado en moscas que expresan (CUG)₄₈₀ en un fondo con una delección que elimina parcialmente la *Atx2* (E). Escala: 100 μm A-C (10 μm en los recuadros), 50 μm D-E.

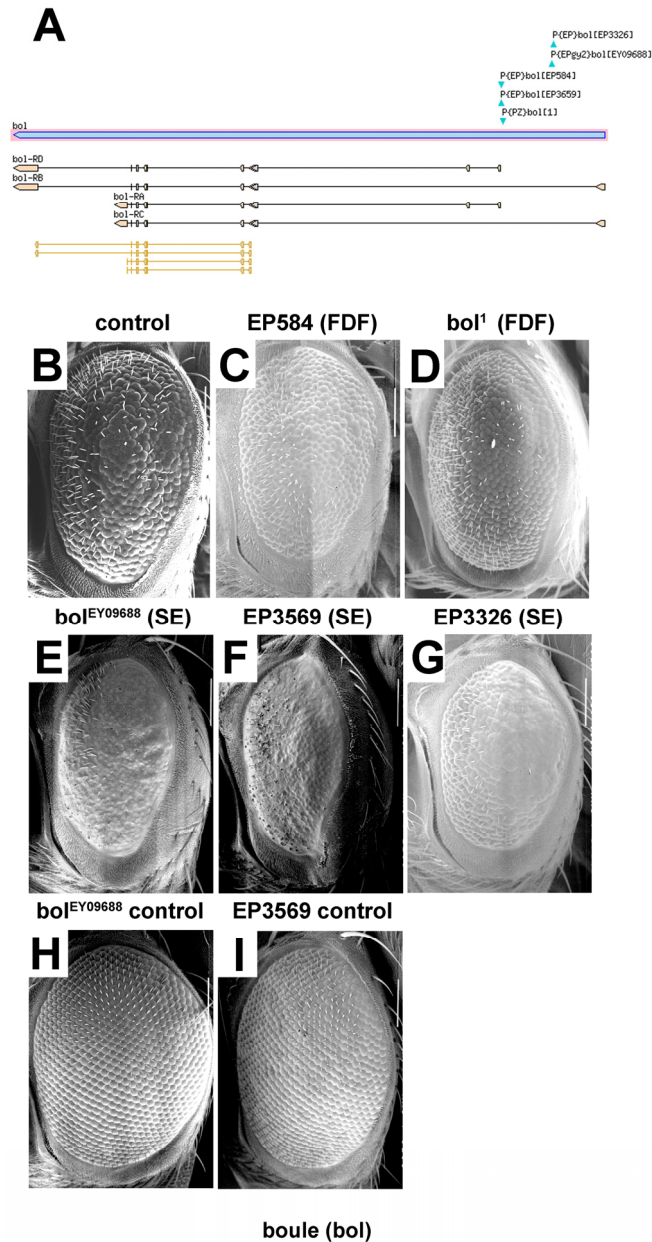


Figura 30. La falta de función del gen *boule* (*bol*) suprime el fenotipo de ojo inducido por la expresión de (CUG)₄₈₀ mientras que la sobre-expresión lo potencia. (A) Estructura del gen *boule*, en azul se muestra el ADN genómico, debajo la estructura de los distintos ARNm y por último en amarillo la parte codificante. En la parte de arriba los triángulos azules dirigidos hacia arriba o hacia abajo muestran la localización de las inserciones utilizadas (hacia arriba significa que están insertados en la dirección de la cadena antiparalela al igual que el gen, hacia abajo significa que están insertados en la dirección contraria). **(B-I)** Imágenes de MEB de un ojo control de una mosca que expresa (CUG)₄₈₀ solo (B), con dos de los alelos de falta de función de *bol* que suprimen el fenotipo de B (C-D) o con 3 alelos de sobre-expresión que potencian el fenotipo (E-G). En H e I se muestran los controles con GMR de los alelos de sobre-expresión en E y F para demostrar que el fenotipo obtenido en ambos casos no se debe a la expresión de *bol* por si mismo.

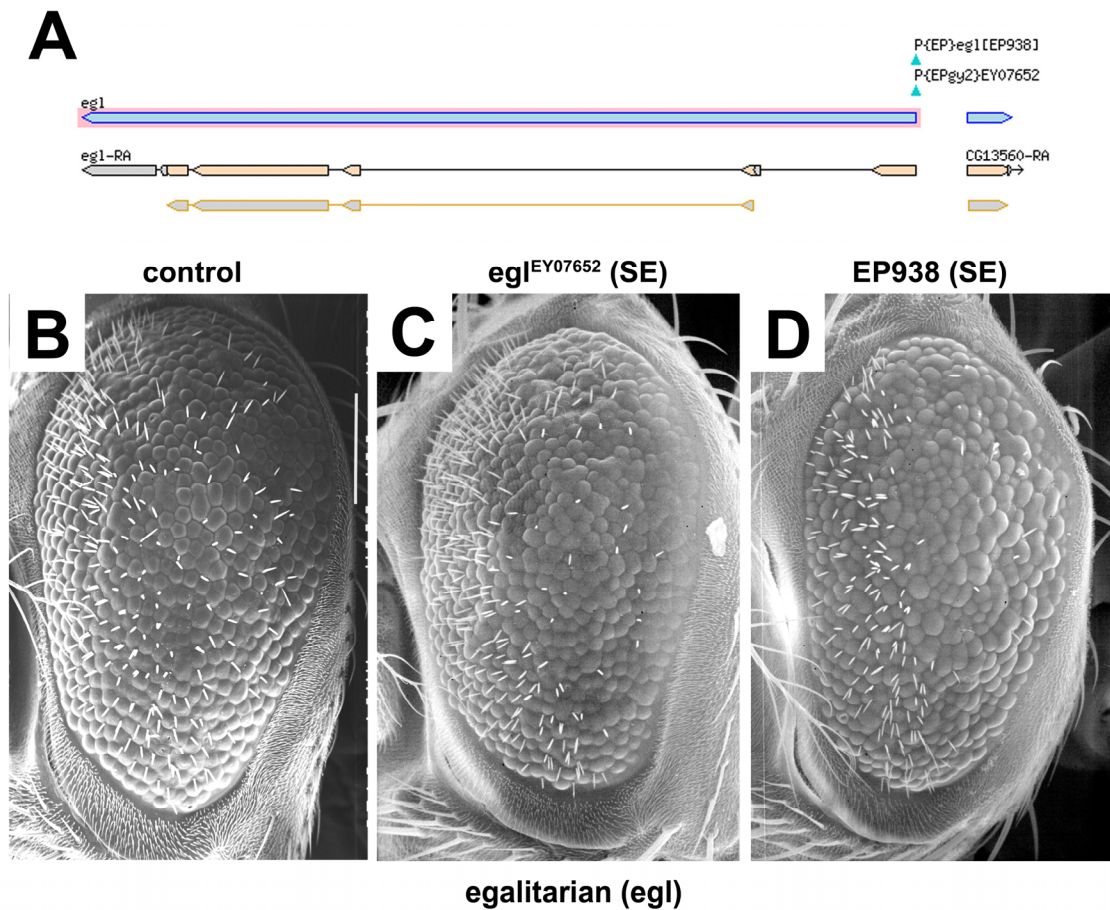
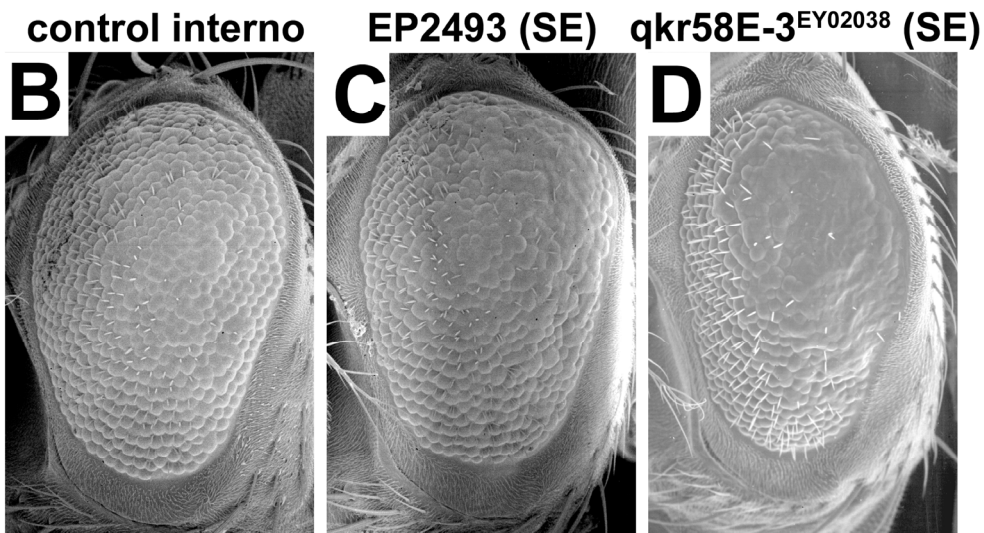
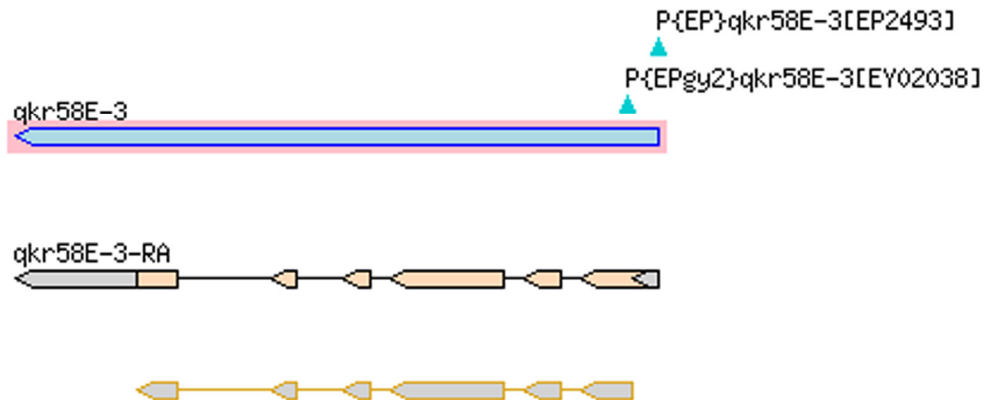


Figura 31. La sobre-expresión del gen *egalitarian* (*egl*) potencia el fenotipo de ojo inducido por la expresión de (CUG)₄₈₀. **(A)** Estructura del gen *egalitarian*, en azul se muestra el ADN genómico, debajo la estructura de los distintos ARNm y por último en amarillo la parte codificante. En la parte de arriba los triángulos azules dirigidos hacia arriba muestran la localización de las inserciones utilizadas (al estar hacia arriba significa que están insertados en la dirección de la cadena antiparalela al igual que el gen). **(B-D)** Imágenes de MEB de un ojo control de una mosca que expresa (CUG)₄₈₀ solo (B) o con dos alelos de sobre-expresión de *egl* que potencian el fenotipo mostrado en B (C-D).

A



quaking related 58E-3 (*qkr58E-3*)

Figura 32. La sobre-expresión del gen *quaking related 58E-3* (*qkr58E-3*) potencia el fenotipo de ojo inducido por la expresión de (CUG)₄₈₀. (A) Estructura del gen *qkr58E-3*, en azul se muestra el ADN genómico, debajo la estructura de los distintos ARNm y por último en amarillo la parte codificante. En la parte de arriba los triángulos azules dirigidos hacia arriba muestran la localización de las inserciones utilizadas (al estar hacia arriba significa que están insertados en la dirección de la cadena antiparalela al igual que el gen). (B-D) Imágenes de MEB de un ojo control de una mosca que expresa (CUG)₄₈₀ solo (B) o con dos alelos de sobre-expresión de *qkr58E-3* que potencian el fenotipo mostrado en B (C-D).

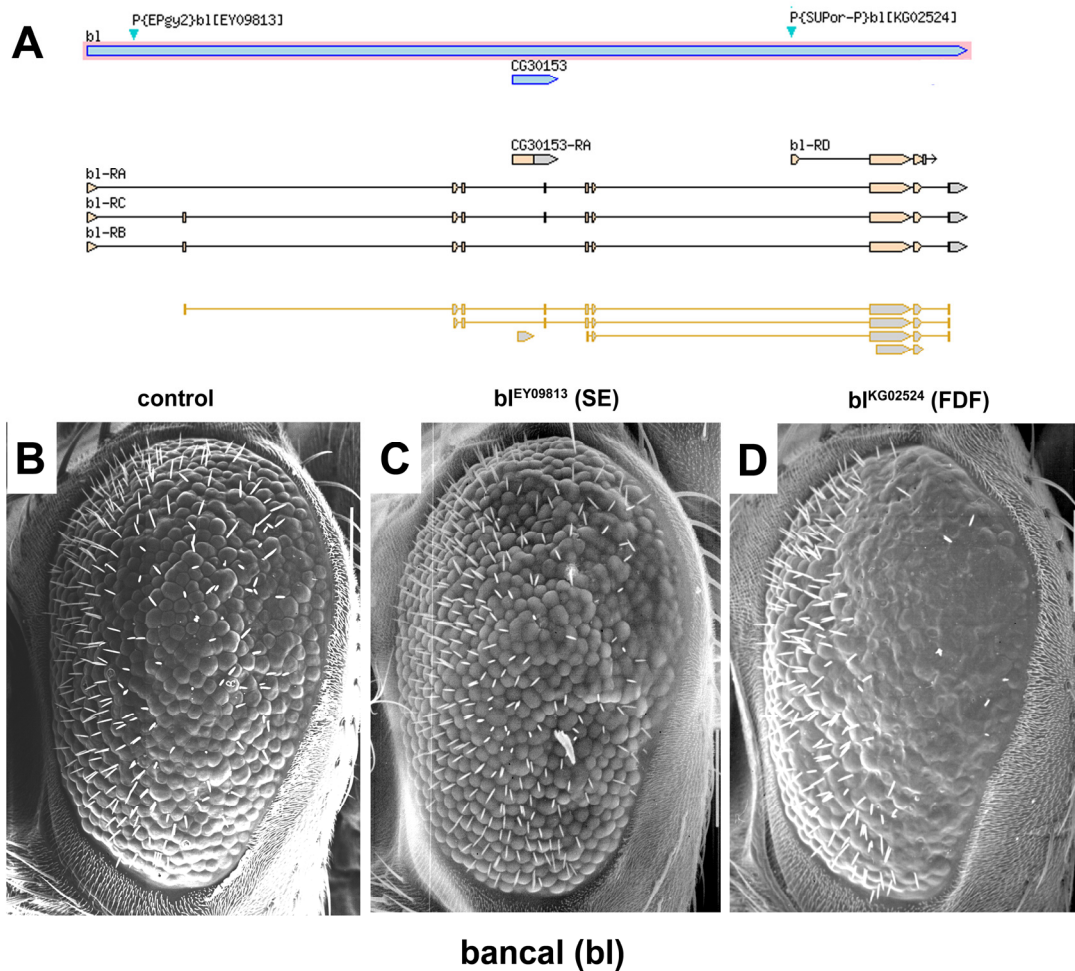


Figura 33. La falta de función del gen *bancal* (*bl*) potencia el fenotipo de ojo inducido por la expresión de (CUG)₄₈₀. (A) Estructura del gen *bancal*, en azul se muestra el ADN genómico, debajo la estructura de los distintos ARNm y por último en amarillo la parte codificante. En la parte de arriba los triángulos azules dirigidos hacia abajo muestran la localización de las inserciones utilizadas (al estar hacia abajo significa que están insertados en la dirección de la cadena paralela o molde al igual que el gen). (B-D) Imágenes de MEB de un ojo control de una mosca que expresa (CUG)₄₈₀ solo (B), con un alelo que podría sobre-expresar (C) o con un alelo de falta de función de *bl* que potencia el fenotipo de B (D).

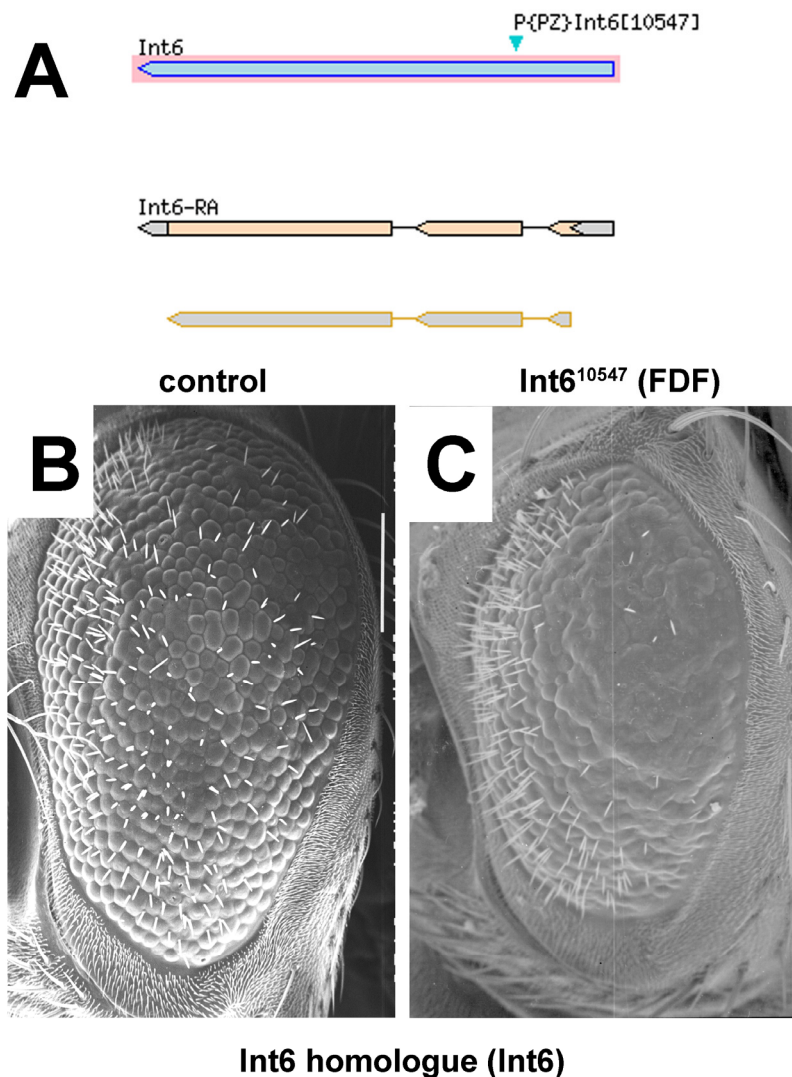


Figura 34. La falta de función del gen *Int6 homologue* (*Int6*) potencia el fenotipo de ojo inducido por la expresión de (CUG)₄₈₀. (A) Estructura del gen *Int6*, en azul se muestra el ADN genómico, debajo la estructura de los distintos ARNm y por último en amarillo la parte codificante. En la parte de arriba el triángulo azul dirigido hacia abajo muestra la localización de la inserción utilizada (al estar hacia abajo significa que está insertado en la dirección de la cadena normal o molde al contrario que el gen). (B-C) Imágenes de MEB de un ojo control de una mosca que expresa (CUG)₄₈₀ solo (B) o con un alelo de falta de función de *Int6* que potencia el fenotipo mostrado en B (C).

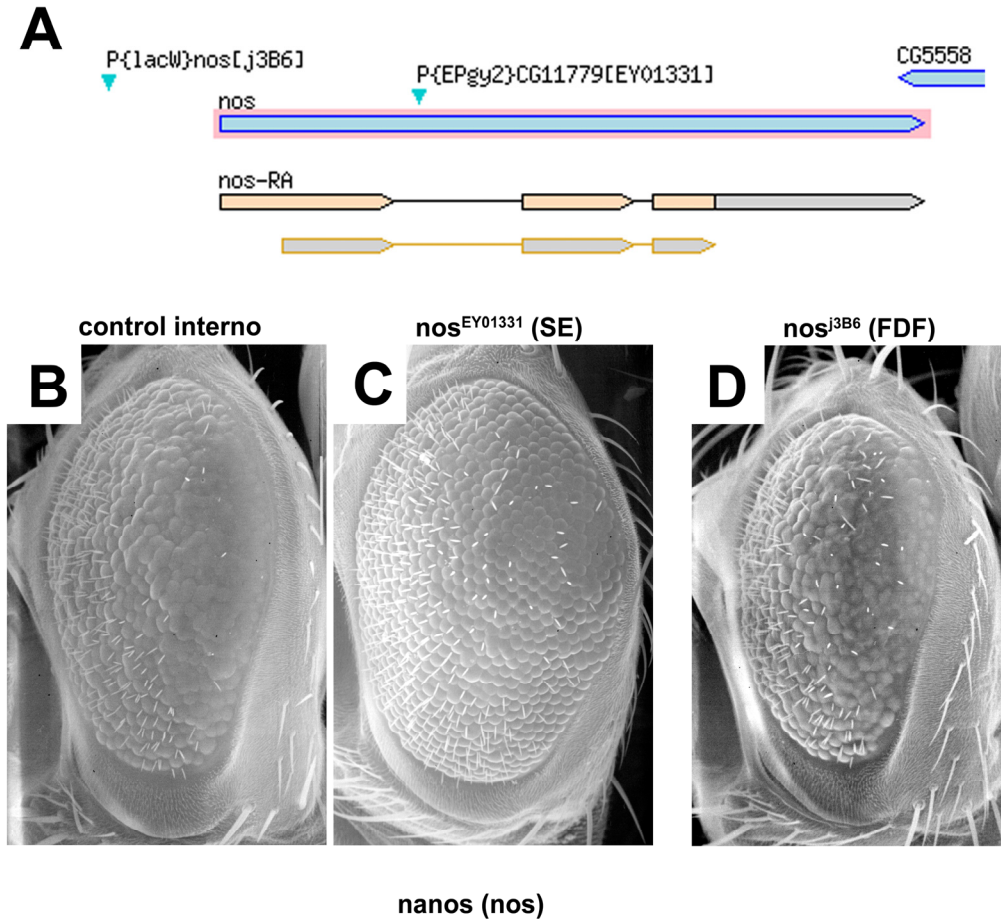


Figura 35. La falta de función del gen *nanos* (*nos*) potencia el fenotipo de ojo inducido por la expresión de (CUG)₄₈₀. (A) Estructura del gen *nanos*, en azul se muestra el ADN genómico, debajo la estructura de los distintos ARNm y por último en amarillo la parte codificante. En la parte de arriba los triángulos azules dirigidos hacia abajo muestran la localización de las inserciones utilizadas (al estar hacia abajo significa que están insertados en la dirección de la cadena normal o molde al igual que el gen). (B-D) Imágenes de MEB de un ojo control de una mosca que expresa (CUG)₄₈₀ solo (B), con un alelo que podría sobre-expresar *nos* que suprime el fenotipo (C) o con un alelo de falta de función de *nos* que potencia el fenotipo de B (D).

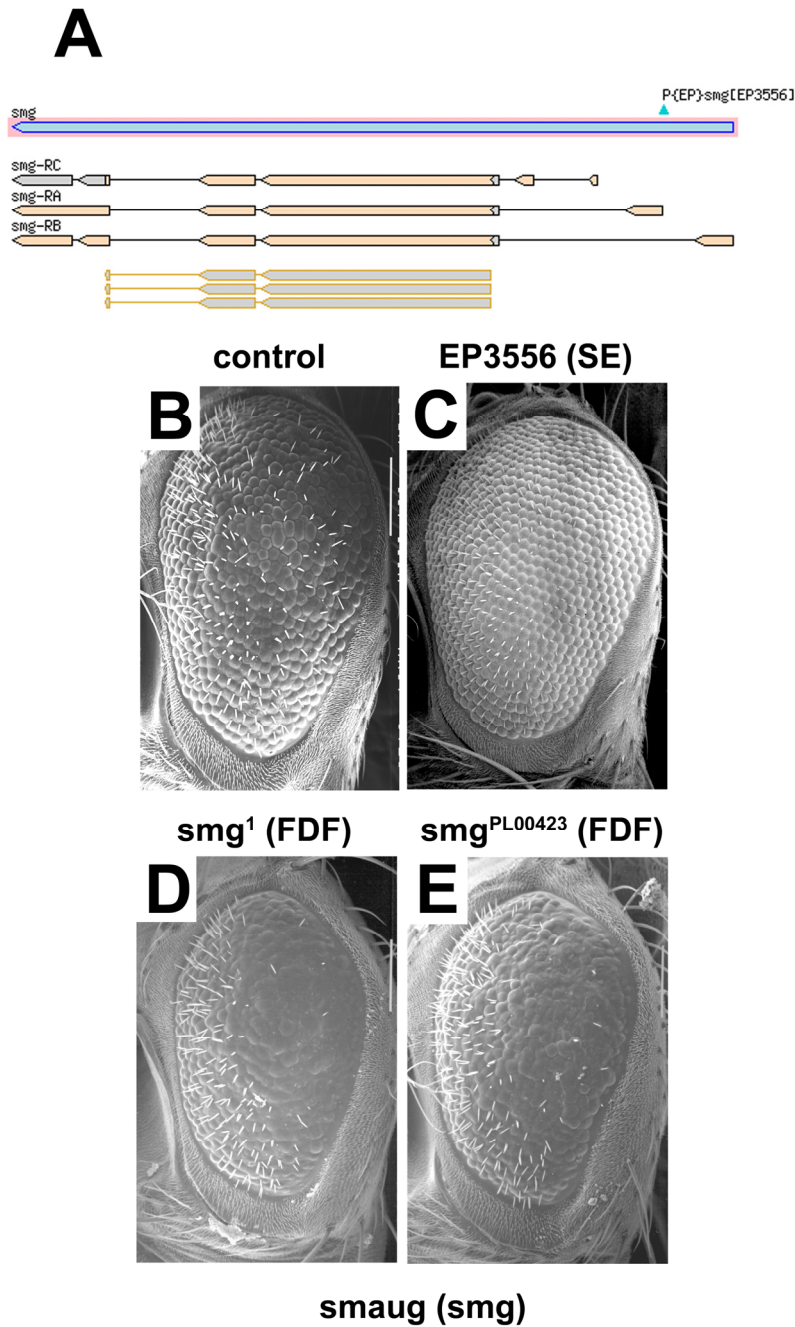


Figura 36. La sobre-expresión del gen *smaug* (*smg*) suprime el fenotipo de ojo inducido por la expresión de (CUG)₄₈₀ mientras que la falta de función lo potencia. (A) Estructura del gen *smaug*, en azul se muestra el ADN genómico, debajo la estructura de los distintos ARNm y por último en amarillo la parte codificante. En la parte de arriba el triángulo azul dirigido hacia arriba muestra la localización de una de las inserciones utilizadas (al estar hacia arriba significa que están insertados en la dirección de la cadena antiparalela al igual que el gen). **(B-E)** Imágenes de MEB de un ojo control de una mosca que expresa (CUG)₄₈₀ solo (B), con un alelo de sobre-expresión que suprime el fenotipo (C), o con dos alelo de falta de función de *smg* que potencian el fenotipo mostrado en B (D-E).

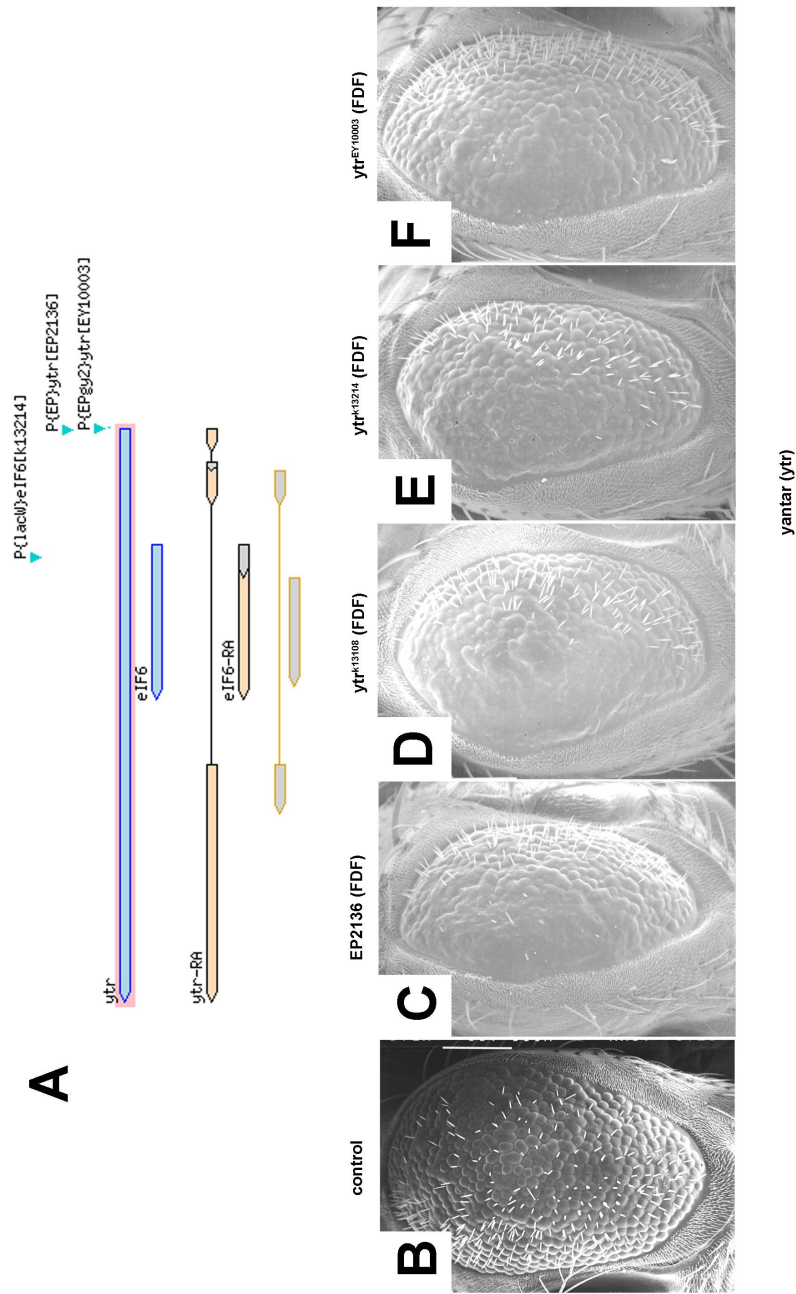


Figura 37. La falta de función del gen *yantar*(*ytr*) potencia el fenotipo de ojo inducido por la expresión de (CUG)₄₈₀. (A) Estructura del gen *yantar*, en azul se muestra el ADN genómico debajo la estructura de los distintos ARNm y por último en amarillo la parte codificante. En la parte de arriba los triángulos azules dirigidos hacia abajo muestran la localización de algunas de las inserciones utilizadas (al estar hacia abajo significa que están insertados en la dirección de la cadena paralela o molde al contrario que el gen). (B-F) Imágenes de MEB de un ojo control de una mosca que expresa (CUG)₄₈₀ solo (B) o con 4 alelos de falta de función de *ytr* que potencian el fenotipo mostrado en B (C-F).

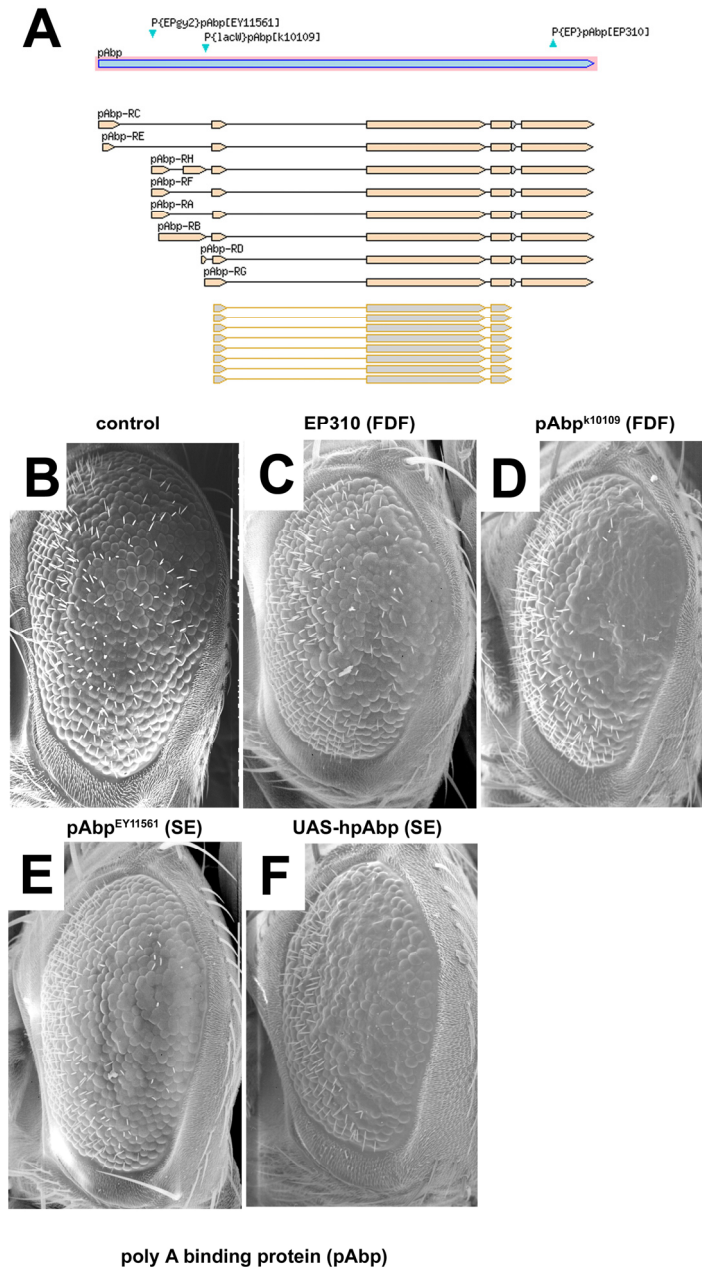


Figura 38. Alteraciones en los niveles del gen *poly A binding protein* (*pAbp*) potencian el fenotipo de ojo inducido por la expresión de (CUG)₄₈₀. (A) Estructura del gen *pAbp*, en azul se muestra el ADN genómico, debajo la estructura de los distintos ARNm y por último en amarillo la parte codificante. En la parte de arriba los triángulos azules dirigidos hacia abajo o hacia arriba muestran la localización de las inserciones utilizadas (los que están hacia abajo significa que están insertados en la dirección de la cadena normal o molde al igual que el gen y el que está hacia arriba en la dirección opuesta). (B-F) Imágenes de MEB de un ojo control de una mosca que expresa (CUG)₄₈₀ solo (B), con dos alelos de falta de función de *pAbp* que potencian el fenotipo mostrado en B (C-D), con un alelo capaz de sobre-expresar *pAbp* (E) y con un UAS-hpAbp que sobre-expresa la proteína homóloga humana que también potencia el fenotipo (F).

5.4.2. *Screen al azar para identificar genes capaces de modificar el fenotipo por mutaciones de falta de función*

En el segundo y tercer *screen* se buscaban genes que fueran capaces de modificar el fenotipo de (CTG)₄₈₀ cuando su actividad es reducida. Se utilizaron dos colecciones distintas de líneas de *Drosophila* para poder cubrir la mayoría del genoma. Una de las colecciones consiste en alrededor de 700 inserciones de elementos P letales que se pueden conseguir de los *stock centers* de *Drosophila*. Estos elementos P han sido seleccionados entre otras miles de inserciones de elementos P generadas como parte de el proyecto del genoma de *Drosophila*. Cada inserción causa la pérdida de función de un gen y no hay redundancia. La última colección utilizada consiste en alrededor de 500 deleciones pequeñas del genoma recientemente publicadas (Parks, Cook et al. 2004). Estas deleciones comparten el mismo fondo genético y han sido definidas molecularmente, es decir, se conocen los puntos de rotura y los genes afectados. Esta colección no solo cubre una gran parte del genoma, alrededor del 56%, sino que la resolución también es bastante alta ya que cada deleción solo incluye un número pequeño de genes (unas 140 kb y una media de 25 genes eliminados por línea).

En el *screen* genético realizado con elementos P se encontró una serie de potenciadores del fenotipo de ojo cuya futura caracterización podría facilitar información sobre nuevas rutas implicadas en la patogenicidad de la DM1 (Tabla 8). De entre todos los genes probados, encontramos uno que resultó ser un buen supresor del fenotipo inducido por el triplete CTG expandido. Un alelo por falta de función del gen *skuld* (*skd*) suprime el fenotipo de degeneración. Posteriormente se probaron más alelos de este gen disponibles y se corroboró esta modificación ya que se encontraron 3 alelos de falta de función más capaces de suprimir el fenotipo (Figura 39).

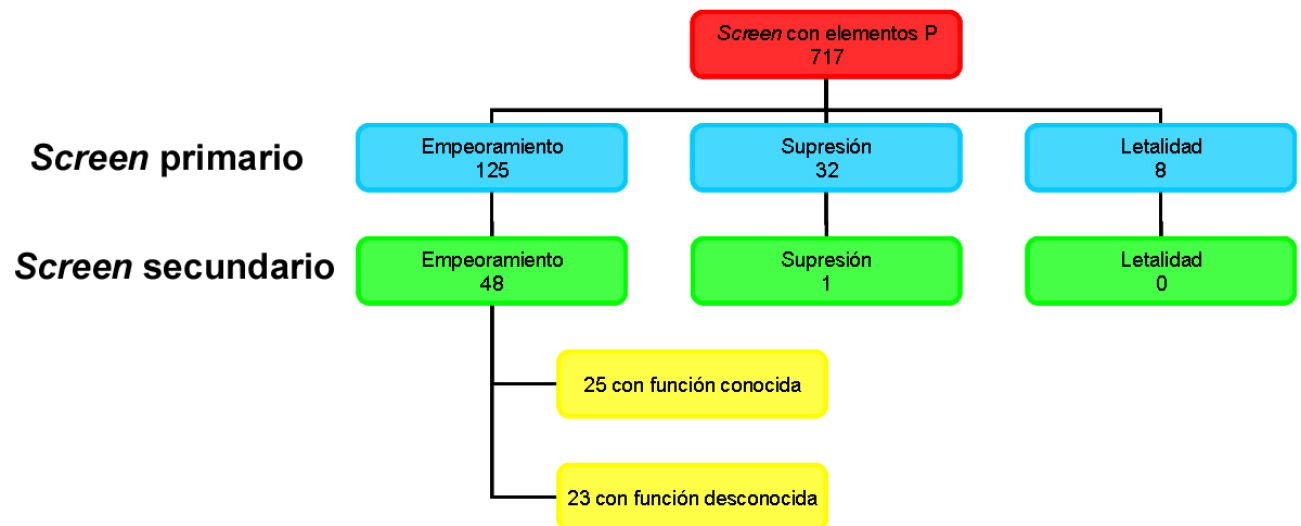


Tabla 7. Diagrama de los resultados obtenidos en el *screen* realizado con elementos P. La tabla muestra el número de líneas utilizadas, el número y tipo de modificación obtenida en los *screens* primario y secundario así como la clasificación de los modificadores por empeoramiento.

<u>Transducción de señales</u>	<u>Stock</u>	<u>Alelo</u>
<i>14-3-3ϵ</i>	12142	<i>14-3-3ϵ^{j2B10}</i>
<i>Akap200</i> (A kinase anchor protein 200)	10656	<i>Akap200^{k07118a}</i>
<i>Cdk4</i> (Cyclin-dependent kinase 4)	10629,	<i>Cdk4^{k06503}, Cdk4^{s4639}</i>
<i>dock</i> (dreadlocks)	12056	<i>dock^{k13421}</i>
<i>sktI</i> (skittles)	10444	<i>sktI^{k12405}</i>
<i>Su(H)</i> (Suppressor of Hairless)	10373	<i>Su(H)^{k07904}</i>
	10689	
<u>Componentes del citoesqueleto</u>		
<i>Cg25C</i> (Collagen Type IV)	10479	<i>Cg25C^{k00405}</i>
<i>insc</i> (isncuteable)	10373	<i>insc^{k12405}</i>
<i>sar1</i>	11669	<i>sar1⁰⁵⁷¹²</i>
<i>syt</i> (synaptotagmin)	10586	<i>syt^{k05909}</i>
<u>Factores de transcripción</u>		
<i>Aly</i>	11562	<i>Aly⁰²²⁶⁷</i>
<i>btb</i> (bumper-to-bumper)	10422	<i>btb^{k09901}</i>
<i>crp</i> (cropped)	10362	<i>crp^{k00809}</i>
<i>hrg</i> (hiiragi)	10676	<i>hrg^{k07619}</i>
<i>spt4</i>	10567	<i>spt4^{k05316}</i>
<u>Regulación de la traducción</u>		
<i>Adam</i>	11116	<i>Adam^{k13906}</i>
<i>Int6</i> (Int6 homologue)	11748	<i>Int6¹⁰⁵⁴⁷</i>
<u>Regulación de la replicación</u>		
<i>Geminin</i>	11118	<i>geminin^{k14019}</i>
<u>Degradación de proteínas</u>		

<i>POSH</i> (Plenty of SH3s)	11146	<i>POSH</i> ^{k15815}
<i>slmb</i> (supernumerary limbs)	11493	<i>slmb</i> 00295
<u>Metabolismo de proteínas</u>		
<i>Fur1</i> (Furin 1)	10341	<i>Fur1</i> ^{rL205}
<u>Metabolismo de lípidos</u>		
<i>Fpps</i> (Farnesyl pyrophosphate synthase)	10604	<i>Fpps</i> ^{k06103}
<u>Metabolismo de ácidos nucleicos</u>		
<i>Adk2-44B</i>	11160	<i>Adk2-44B</i> ^{k16120}
<u>Canales iónicos</u>		
<i>Fer2LCH</i> (Ferritin 2 light chain homologue)	11483	<i>Fer2LCH</i> ⁰⁰⁰³⁵
<u>Ritmo circadiano</u>		
<i>B4</i>	10649	<i>B4</i> ^{k06917}

Tabla 8. Lista de genes cuya falta de función potencia en fenotipo inducido por la expresión de CUGs expandidos descubiertos en el *screen* con elementos P. Se muestran los genes clasificados en distintas categorías según su función, y se muestra el *stock* utilizado y el alelo correspondiente.

<u>Stock</u>	<u>Alelo</u>	<u>Tipo de alelo</u>	<u>Modificación</u>
10197	<i>skd</i> ^{rK760}	P-FDF	Supresión
10198	<i>skd</i> ^{L7062}	P-FDF	Supresión
5047	<i>Skd</i> ²	R _γ -FDF	Supresión
16819	P{EPgy2} <i>skd</i> ^{EY07369}	EP-SE	No
EP3375	EP3375	EP-FDF	Supresión
EP3443	EP3443	EP-SE	No

Tabla 9. Tabla de los alelos disponibles para el gen *skuld*. Se muestra el número de *stock*, el alelo correspondiente, el tipo de alelo y la modificación obtenida sobre el modelo de DM1 en el ojo. (P= elemento P, EP= *enhancer P element*, R_γ= mutación producida por rayos γ , FDF= falta de función, SE= sobre-expresión)

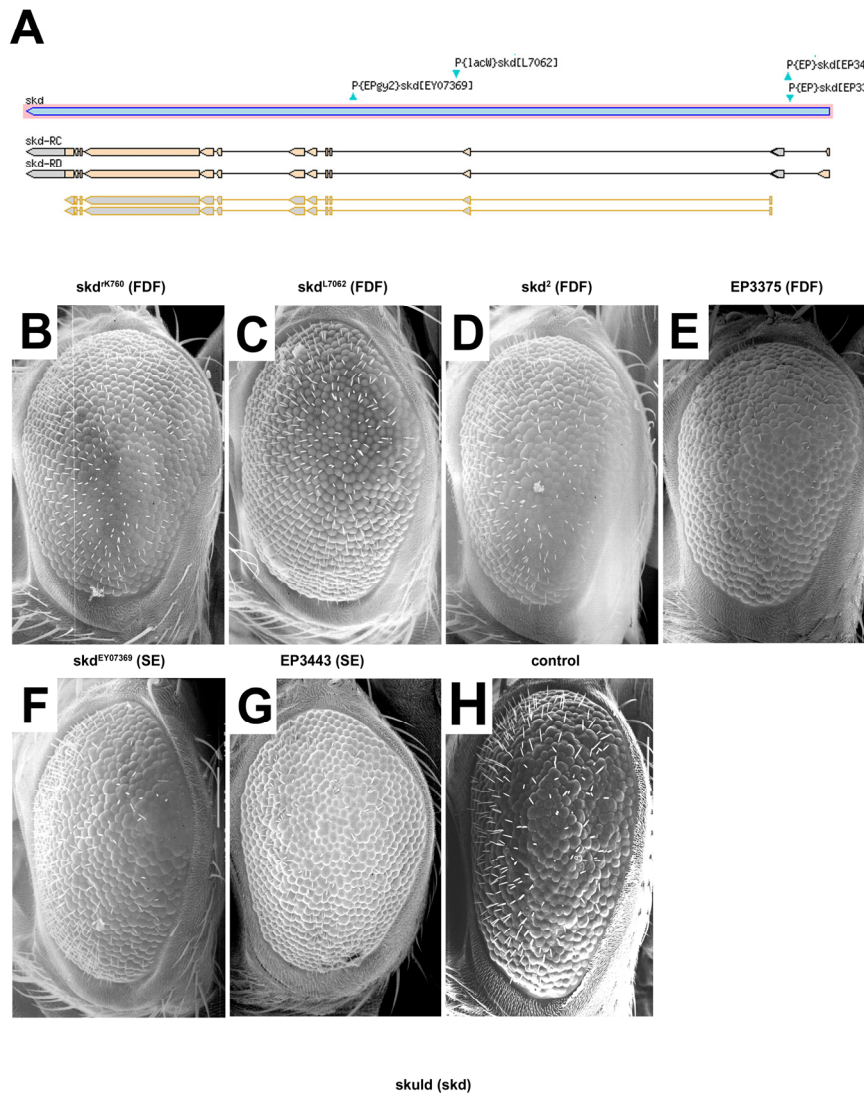


Figura 39. La falta de función de *skuld* suprime el fenotipo inducido por (CUG)₄₈₀. (A) Representación esquemática del gen *skuld*. La línea azul muestra el área que ocupa en el genoma, debajo se ven los distintos ARNm y por último en amarillo la región codificante. En la parte de arriba se muestra la situación de las distintas inserciones y su orientación (los triángulos azules hacia abajo indican que la inserción está orientada en la misma dirección que la cadena positiva y los triángulos hacia arriba indican que lo están en la dirección opuesta). (B-E) Imágenes de MEB del efecto producido en el ojo por los alelos de falta de función de *skuld*, en este caso de supresión. (F-G) Imágenes de MEB de los alelos de sobre-expresión de *skuld* que en este caso no producen ningún cambio en el fenotipo. (H) Ojo control que expresa solo (CUG)₄₈₀.

Por otro lado, en el *screen* realizado con la colección de deficiencias también se recuperaron varias líneas capaces de potenciar el fenotipo de ojo (Tabla 10). El hecho de que cada deficiencia cubre a varios genes complica la tarea de dilucidar cual gen dentro de cada deficiencia descrita como potenciadora es el responsable de la

modificación. Por otro lado, fueron recuperadas 2 deficiencias capaces de suprimir el fenotipo de ojo (Figura 40). La deficiencia *Df(1)Exel6221* cubre un área pequeña y deleta 13 genes completamente y uno parcialmente (Figura 41). La deficiencia *Df(3R)Exel6178* cubre la región cromosómica 90E7-91A5 y deleta 49 genes más otros 3 que quedan parcialmente deletados (Figura 42).

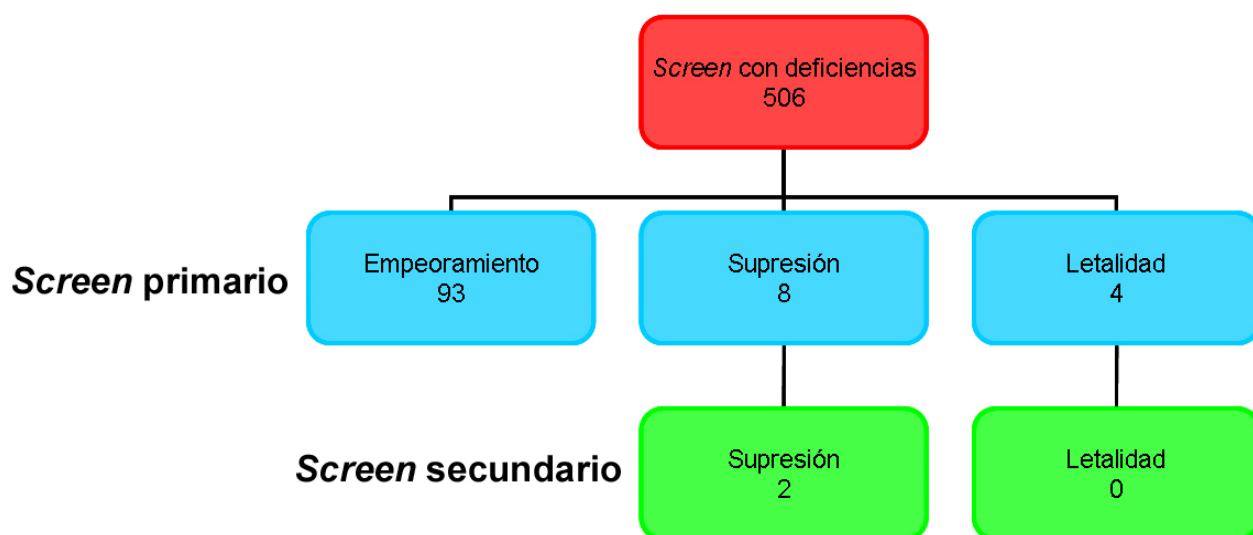


Tabla 10. Diagrama de los resultados obtenidos en el *screen* realizado la colección de deficiencias. La tabla muestra el número de líneas y el tipo de modificación obtenida en el *screen* primario. También se muestra el número de líneas obtenidas en el *screen* secundario con las líneas recuperadas como supresores o como letales.

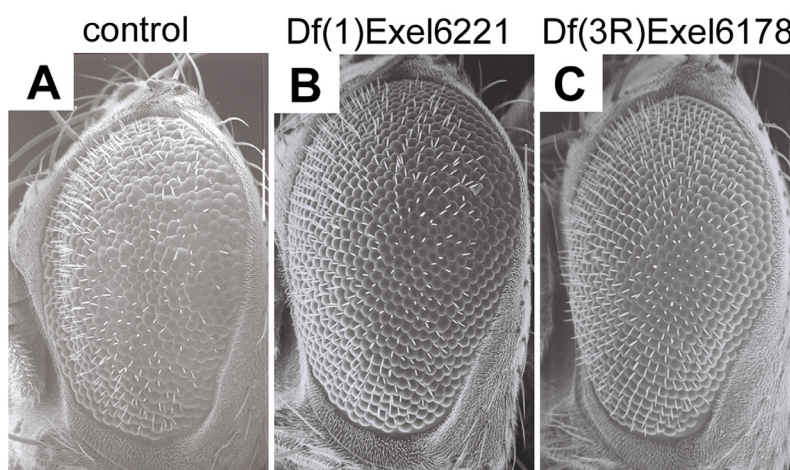


Figura 40. Las deficiencias *Df(1)Exel6221* y *Df(3R)Exel6178* suprimen el fenotipo de ojo de nuestro modelo de DM1. Imágenes de MEB de un ojo control con el fenotipo característico de las moscas DM1 (A), y las dos deficiencias capaces de suprimirlo (B-C).

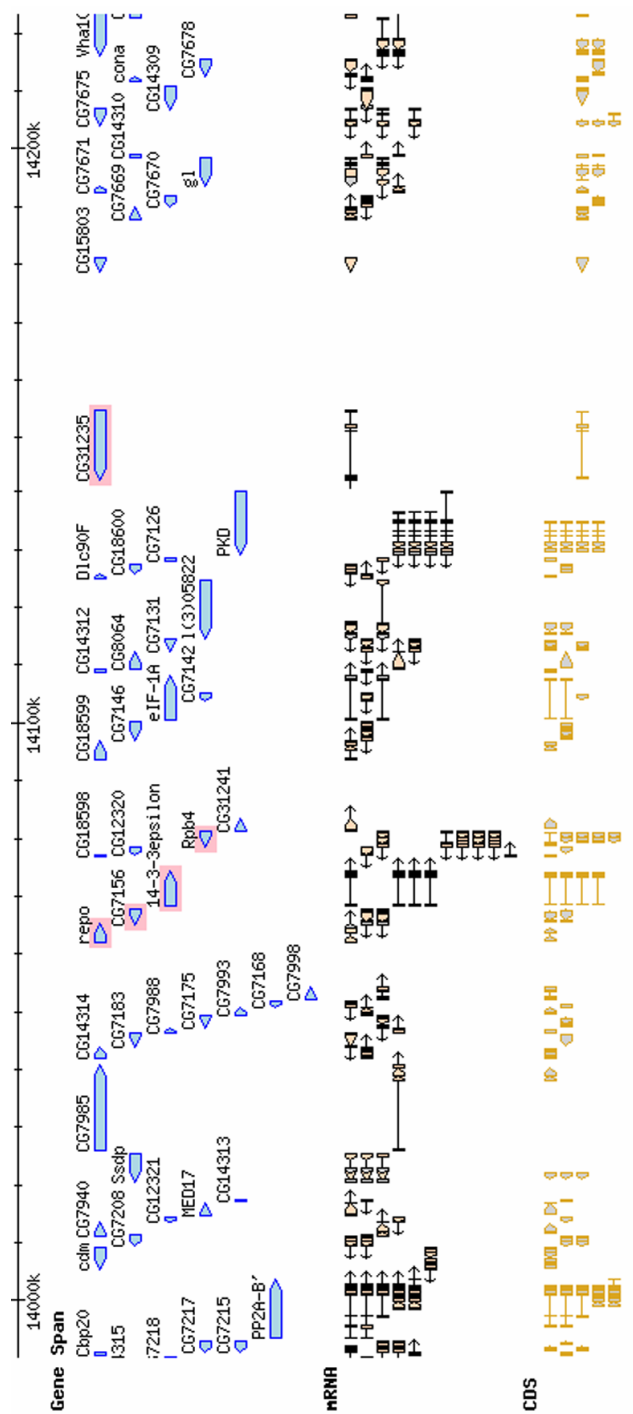


Figura 42. Área deletada en la deficiencia *Df(3R)Exel6178*. El área deletada empieza en la banda cromosómica 90E7 y finaliza en la banda 91A5. Quedan eliminados 49 genes en su totalidad y 3 parcialmente.

6. DISCUSIÓN

Varias líneas de estudio independientes apoyan la hipótesis de que la patogénesis en la enfermedad DM1 es consecuencia de la toxicidad producida por una ganancia de función del ARN. La DM2 es causada por una mutación relacionada pero distinta de la de la DM1 (CCTGs en lugar de CTGs) en un locus no relacionado con el gen de la DM1 (Liquori, Ricker et al. 2001). Por otro lado, el modelo de ratón transgénico que expresa CUGs expandidos en músculo esquelético desarrolla miotonía y miopatía (Mankodi, Logigian et al. 2000), y el *knockout* de *muscleblind* también muestra muchas de las características patológicas de la DM1 (Kanadia, Johnstone et al. 2003), lo cual apoya la idea de que los CUGs expandidos secuestran a las proteínas Muscleblind.

6.1. El modelo de *Drosophila* reproduce fenotipos característicos de la DM1

Para investigar la hipótesis de la ganancia de función del ARN y los mecanismos de la patogénesis inducida por los CUGs expandidos, generamos el modelo transgénico de DM1 en *Drosophila* mediante la inserción de (CTG)₄₈₀ en el genoma y utilizando el sistema GAL4-UAS. Existen otros modelos de enfermedades humanas en *Drosophila* que han demostrado ser útiles como herramienta para investigar los mecanismos de estas (Fortini and Bonini 2000; Zoghbi and Botas 2002; Shulman, Shulman et al. 2003).

Mediante el trabajo realizado en este estudio, se encontró que la expresión de ARNs con (CUG)₄₈₀ en el músculo conduce a una disfunción y degeneración progresiva de los músculos somáticos. Además, encontramos que los transcritos expandidos (CUG)₄₈₀ se acumulan en fosas nucleares en las células musculares. Estas fosas son una característica importante en la DM1 y su presencia en los núcleos de las células musculares de la mosca contribuye a dar validez a este modelo de DM1 en *Drosophila*. La expresión de (CUG)₄₈₀ también produce un fenotipo de degeneración en el ojo con desorganización, fusión de omatidios y reducción del tamaño que se correlaciona con el que se observa en el músculo. Este fenotipo de ojo se ha utilizado como ensayo para realizar *screens* genéticos mediante los cuales hemos podido identificar nuevos modificadores de la toxicidad inducida por (CUG)₄₈₀.

El *splicing* aberrante de varios transcritos ha sido descrito para varios genes en tejidos con DM1 (Tabla 2). En el modelo de DM1 presentado en este estudio hemos sido capaces de reproducir los fallos en el *splicing* en el gen que codifica para el Receptor de Rianodina en *Drosophila*, gen cuyo *splicing* está alterado en pacientes con DM1. Este resultado demuestra que aunque las secuencias y los sitios de *splicing* no están conservados entre humanos y *Drosophila* deben existir proteínas y rutas que si lo están. Esto indica que genes que podamos encontrar en el futuro con *splicing* aberrante en el modelo de DM1 serán relevantes para su estudio en mamíferos. Por otro lado también encontramos fallos en el *splicing* del gen que codifica para la Miofilina, una proteína de los músculos que aunque no tenga homólogo en otras especies muestra un patrón de *splicing* aberrante parecido a lo que se observa en humanos ya que se ven en adultos isoformas que corresponden a estadios del desarrollo más temprano (Figura 27), como ocurre con los genes afectados en pacientes con DM1.

Durante la realización de esta investigación fue publicado un modelo de DM1 en *Drosophila* con (CTG)₁₆₂ que muestra acumulación del triplete expandido en fosas nucleares y co-localización con Muscleblind, pero no muestra ninguna señal de fenotipos patológicos en músculo u otros tejidos (Houseley, Wang et al. 2005). De forma parecida, las moscas utilizadas en nuestro estudio que expresan (CUG)₂₀₀ no muestran fenotipos ni en el ojo ni en el músculo. Parece por tanto, que un número menor a 200 repeticiones de CUGs no son suficientes para desencadenar efectos patogénicos en *Drosophila*.

6.2. MBNL1 y CUGB-P1 modulan los fenotipos de degeneración en el modelo de DM1 de *Drosophila*

Se ha demostrado que las 3 proteínas MBNL en mamíferos que han sido identificadas (MBNL1, MBNL2 y MBNL3) co-localizan con las fosas nucleares que contienen CUGs expandidos *in vivo* (Miller, Urbinati et al. 2000; Fardaei, Larkin et al. 2001; Fardaei, Rogers et al. 2002). En este trabajo se probó la hipótesis de que el secuestro y la pérdida de la función normal de Muscleblind es un factor crítico en la patogenicidad de la DM1. Hemos encontrado que MBNL1 muestra una distribución difusa en los núcleos de los músculos de *Drosophila*. Sin embargo, en presencia de

(CUG)₄₈₀, MBNL1 se acumula en las fosas nucleares y desaparece del resto del núcleo.

Por otro lado, encontramos que la pérdida de función de Muscleblind utilizando un alelo de falta de función en heterocigosis de *muscleblind* en *Drosophila* potencia el fenotipo de ojo. Esta observación, junto con el resultado del secuestro de MBNL1 en las fosas con (CUG)₄₈₀, indica que Muscleblind está deplecionado. Lo que es más, hemos encontrado que sobre-expresando MBNL1 somos capaces de suprimir los fenotipos tanto de ojo como el de músculo producidos por (CUG)₄₈₀. El grado de supresión depende del nivel de sobre-expresión de MBNL1, ya que altos niveles de MBNL1 también causan un fenotipo de degeneración. Por tanto, parecería que los niveles basales de MBNL, son importantes para mantener la fisiología normal del músculo. Estos resultados apoyan el modelo de secuestro de MBNL en la patogenicidad de la DM1 y constituyen la primera demostración de que la toxicidad inducida por el triplete CTG expandido puede ser suprimida.

En un artículo recientemente publicado se ha demostrado por primera vez como un gen cuyo *splicing* está alterado en músculo esquelético de individuos con DM1 también lo está en embriones de moscas homocigóticas para una mutación de falta de función de *muscleblind*. Se trata del gen *ZASP/LDB3* que codifica para la proteína con dominio PDZ de las bandas Z que sufre *splicing* alternativo (Z-band alternatively spliced PDZ-domain protein) (Machuca-Tzili, Brook et al. 2005). Las moscas mutantes para *muscleblind* tienen defectos en el músculo como la disrupción de bandas Z (Artero, Prokop et al. 1998) que también ha sido descrita en pacientes con DM1 (Klinkerfuss 1967; Ludatscher, Kerner et al. 1978). Esta información también va en concordancia con el modelo aquí presentado ya que apoya la teoría de que la pérdida de Muscleblind es importante para la enfermedad y para mantener la fisiología del músculo.

Los modelos de ratón que expresan CUG-BP1 muestran alteraciones en el *splicing* alternativo de algunos transcritos (Ho, Bundman et al. 2005) y reproducen algunos de los fenotipos histopatológicos que se dan en el músculo con DM1 (Timchenko, Patel et al. 2004). En este trabajo hemos encontrado que la expresión de CUG-BP1 por si solo en los músculos somáticos de *Drosophila* conduce a un fenotipo

de pérdida muscular parecido al que observamos cuando expresamos (CUG)₄₈₀. Esta observación es consistente con estudios anteriores que describen el efecto de la sobre-expresión de CUG-BP1 en ratones (Timchenko, Patel et al. 2004; Ho, Bundman et al. 2005). En concordancia con lo descrito para células con DM1 (Michalowski, Miller et al. 1999; Fardaei, Larkin et al. 2001), los núcleos de las células musculares en *Drosophila* que co-expresan CUG-BP1 y (CUG)₄₈₀ muestran un patrón difuso de acumulación de CUG-BP1 pero no existe agregación ni co-localización con las fosas nucleares, aunque el aumento en el número de fosas (CUG)₄₈₀ indica una interacción específica entre el ARN expandido y CUG-BP1. En este trabajo quisimos probar si aumentando los niveles de CUG-BP1 se potencia el fenotipo inducido por el ARN expandido. Encontramos que la co-expresión de CUG-BP1 y (CUG)₄₈₀ contribuye a agravar los fenotipos de pérdida muscular y degeneración. Este resultado es consistente con la idea de que el aumento en la actividad de CUG-BP1 en tejidos con DM1 es relevante para la patogénesis de la DM1.

La sobre-expresión de MBNL1 reduce el porcentaje de núcleos con varias fosas (Figura 16), mientras que la sobre-expresión de CUG-BP1 aumenta este porcentaje (Figura 19). Por tanto, encontramos una correlación positiva entre el número de fosas por núcleo y la severidad del fenotipo de degeneración muscular.

6.3. Nuevas proteínas de unión a ARN implicadas en la enfermedad

Para aprender más sobre la patogénesis inducida por ARN expandido en la DM1, llevamos a cabo una serie de *screens* genéticos. En un primer *screen* genético dirigido usamos una colección de proteínas de unión a ARN ya conocidas en *Drosophila*. Dentro de esta colección hemos descubierto varios genes capaces de modificar los fenotipos de ojo inducidos por la expresión de (CUG)₄₈₀.

Dentro de las proteínas de unión a ARN, hemos encontrado 5 que parecen tener un papel directo en la regulación de la traducción del ARNm: Nanos, Smaug, Ataxina 2, Poly-A binding protein, e Int-6 homologue. Nanos y Smaug son supresores por sobre-expresión y potenciadores por falta de función (Figuras 35 y 36). La Ataxina 2 suprime tanto el fenotipo de ojo como el de músculo por falta de función y potencia por sobre-expresión (Figura 29), mientras que pAbp potencia el fenotipo

tanto por sobre-expresión como por falta de función (Figura 38). Int-6 potencia por falta de función (Figura 34).

Los mecanismos de regulación génica post-transcripcionales tienen un papel muy importante durante el desarrollo embrionario ya que en el oocito y en las primeras etapas del embrión se dan fases en las que no hay transcripción y la expresión génica depende únicamente de los ARNm maternos acumulados en el oocito, los cuales se regulan al nivel de traducción y de estabilización del ARNm. Durante la ovogénesis de *Drosophila* el ARNm de *oskar* (*osk*) se localiza en el polo posterior del oocito donde se traduce y la proteína Osk recluta al ARNm de *nanos* (*nos*) (Wang and Lehmann 1991). La proteína Nos solo se produce en la parte posterior del oocito (Gavis and Lehmann 1994). Tanto la activación de la traducción de *nos* en el polo posterior, como su represión en el resto del embrión son esenciales para el desarrollo del abdomen y la segmentación de la cabeza y del tórax (Smibert, Wilson et al. 1996; Dahanukar, Walker et al. 1999). Nanos es un represor de la traducción del ARNm materno de *bicoid* (*bcd*) cuya localización en la parte anterior del embrión de *Drosophila* y represión en el resto del embrión es necesaria para el desarrollo embrionario correcto. Por otro lado, Nanos junto con Pumilio (Pum) forman un complejo represor de la traducción del ARNm de *hunchback* (*hb*) también necesario para el desarrollo del eje anteroposterior (Johnstone and Lasko 2001). Recientemente ha sido descrito que Nos y Pum también son requeridos en el control de la morfogénesis de dendritas probablemente también formando un complejo de control de la traducción (Ye, Petritsch et al. 2004).

Smaug (Smg) es un represor de la traducción encargado de mediar la represión de la traducción del ARNm deslocalizado de *nos* en el embrión de *Drosophila* (Smibert, Wilson et al. 1996). El ARNm de *nos* tiene dos copias de una secuencia en la parte proximal de la región 3' no traducida conocida como SRE (elementos que reconocen a Smaug o "Smaug recognition elements" en inglés), que son los mediadores principales de la represión (Smibert, Wilson et al. 1996; Smibert, Lie et al. 1999). Tras la unión de Smg a la región 3' no traducida de *nos* se recluta un complejo de deasilación. La deasilación del ARNm de *nos* produce su degradación y consecuente represión de su traducción (Zaessinger, Busseau et al. 2006). En la parte posterior del embrión Osk previene la unión de Smg al ARNm de *nos*, no se sabe si

uniéndose directamente a Smg o reclutando otra proteína al complejo que forman con *nos* (Zaessinger, Busseau et al. 2006).

En humanos aún se desconoce la función de la Ataxina 2; se trata de una proteína citoplasmática de 140 kDa con motivos implicados en el *splicing* de ARN (Huynh, Del Bigio et al. 1999; Huynh, Figueroa et al. 2000). Dos observaciones sugieren que la Ataxina 2 está implicada en el metabolismo de ARN: contiene secuencias de amino ácidos de unión a la proteína de unión a poli(A) (Kozlov, Trempe et al. 2001) e interactúa con una proteína de unión a ARN citoplasmática (proteína de unión a Ataxina 2 o A2BP de sus siglas en inglés) en un ensayo de doble híbrido en levaduras (Shibata, Huynh et al. 2000). El ortólogo en *Drosophila*, *dAtx2*, parece tener una función como regulador de la formación de los filamentos de Actina (Satterfield, Jackson et al. 2002), lo cual es importante para entender el papel que pueda tener en la modificación de los fenotipos musculares de nuestro modelo de DM1 ya que la Actina es el componente principal de los músculos. Más recientemente ha sido demostrado que *dAtx2* interacciona con ARNm a través de un dominio N terminal, e indirectamente vía PABP la cual está directamente unida al ARNm, y además localiza en polirribosomas. El dominio responsable de la unión a PABP está en extremo C terminal. Esto parece indicar que la Ataxina 2 tiene un papel directo en la regulación de la traducción (Satterfield and Pallanck 2006).

La mayoría de los ARNm eucarióticos sufren modificaciones post-transcripcionales considerables como *capping*, *splicing* y poliadenilización. Durante el proceso de poliadenilización se añaden colas de poli(A)s en las regiones 3' que facilitan sitios de unión para una clase de factores reguladores llamados proteínas de unión a poli(A) (PABPs de sus siglas en inglés). Las PABPs carecen de actividad catalítica pero son importantes en la mediación de la expresión génica, ya que forman parte de la plataforma necesaria para la unión de factores cruciales para la expresión génica. Además son antagonistas de otros factores que de unirse permitirían los pasos terminales de degradación del ARNm. En el citoplasma, las PABPs facilitan la formación del “bucle cerrado”, estructura de la partícula ribonucleoprotéica mensajera que es crucial adquirir para las funciones adicionales de PABP que promueven la iniciación y la terminación de la traducción, el reciclado de ribosomas, y la estabilidad del ARNm (Mangus, Evans et al. 2003).

Un alelo de falta de función del gen *Int-6* modifica el fenotipo inducido en el ojo por la expresión de (CUG)₄₈₀. Este gen codifica para una subunidad del complejo eucariótico de inicio de la traducción eIF-3. El complejo proteínico eIF-3 está compuesto de 10 unidades que tienen un papel importante en la unión del met-tARN y el ARNm a la subunidad 40s del ribosoma (Asano, Merrick et al. 1997).

Estas observaciones revelan un nuevo mecanismo de patogénesis en nuestro modelo de DM1 en el cual está involucrada la maquinaria de traducción del ARNm. Alteraciones en los niveles de proteínas de la maquinaria de traducción podrían causar carencias en factores necesarios para el funcionamiento de los sistemas muscular y nervioso.

Dos de los genes identificados como modificadores en nuestro *screen* con proteínas de unión a ARN parecen estar implicados en cascadas de control del ciclo celular y maduración del sistema nervioso: *bancal* y *boule*.

La falta de función del gen *bancal* (*bl*) potencia el fenotipo de ojo inducido por la expresión de (CUG)₄₈₀ (Figura 33). Los ARNm derivan de ARNs heterogéneos nucleares (hnRNAs del nombre en inglés) que se asocian a proteínas nucleares específicas y forman complejos de ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNP del nombre en inglés). Más de 10 homólogos de las hnRNP de los vertebrados han sido caracterizadas en *Drosophila* (Matunis, Matunis et al. 1992). El producto del gen *bancal* es una proteína homóloga de la proteína hnRNP K de vertebrados. La proteína hnRNP K en vertebrados está implicada en varios pasos de la expresión génica, como transcripción, *splicing*, estabilidad del ARNm y traducción (Bomsztyk, Denisenko et al. 2004). Tiene tres motivos de unión a ARN de tipo KH (de K homology) y una caja RGG (dominio rico en argininas (R) y glicinas (G)) así como varios dominios de unión a proteínas (Bomsztyk, Denisenko et al. 2004). Las proteínas humanas y de *Drosophila* presentan el mayor porcentaje de similitud en las secuencias de los dominios KH (KH1 73%, KH2 65% y KH3 75% de similitud) (Bomsztyk, Denisenko et al. 2004). En *Drosophila*, *bancal* ha sido implicada en el desarrollo de apéndices, ya que alelos de falta de función producen adultos con apéndices cortos como consecuencia de una reducción en el número de divisiones

celulares en los discos imaginales (Charroux, Angelats et al. 1999). Por otro lado, en cultivos de células neuronales ha sido demostrado que *bancal* está implicada en el arresto del ciclo celular y la consecuente maduración de las neuronas (Yano, Okano et al. 2005). Parecería por tanto, que hnRNP K o *bancal* promueve la proliferación celular y tiene un efecto negativo sobre la promoción de eventos de diferenciación. El hecho de que hnRNP K esté presente en tantos pasos durante la expresión génica como se mencionó arriba, sugiere que existen varias maquinarias de expresión génica que usan hnRNP K para integrar señales de cascadas de kinasas (ver revisión en (Bomsztyk, Denisenko et al. 2004)).

La sobre-expresión del gen *boule* potencia el fenotipo de nuestro modelo de DM1, y una mutación por falta de función lo suprime (Figura 30). El gen *boule* codifica para una proteína que contiene un dominio de unión a ARN de tipo ribonucleoproteína homólogo al gen *DAZ* (Deleted in Azoospermia) de humanos (Eberhart, Maines et al. 1996). La familia de genes *DAZ* codifican proteínas de unión a ARN específicas de la línea germinal y forman un grupo de 4 genes en el cromosoma Y humano. Los humanos también tiene dos genes autosómicos, el gen *DAZ-like* (*DAZL*) en el cromosoma 3 y *BOULE* (Xu, Lee et al. 2003). *Boule* tiene dos motivos RRM cerca del extremo N terminal así como motivos *DAZ* comunes con las proteínas *DAZ*, *DAZL* y *BOULE* humanas (Xu, Moore et al. 2001). En *Drosophila*, *Boule* regula post-transcripcionalmente a *Twine* (proteína homóloga de la fosfatasa *Cdc25* humana). *Twine* es un regulador del ciclo celular clave necesario para que las células germinales entren en meiosis (Maines and Wasserman 1999). *Boule* no solo es importante en la espermatogénesis, sino que también se expresa en el sistema nervioso donde se ha observado que cuando se aumentan sus niveles de expresión se dan fenotipos mutantes en las comunicaciones neurales entre las células de la retina y de la lámina del ojo de la mosca, y en la habilidad locomotriz de las larvas. En el sistema nervioso *Boule* también regula a *Twine* (Joiner and Wu 2004).

Tanto *bancal* como *boule* parecen ser importantes en la maduración del sistema nervioso. Su estudio en el futuro podría ayudar a entender algunos de los fenotipos relacionados en el sistema nervioso como las deficiencias cognitivas o el retraso mental que se da en pacientes con DM1 congénita.

Egalitarian es un factor importante para la localización del ARN durante el desarrollo embrionario de *Drosophila*. La sobre-expresión de *egl* potencia el fenotipo de ojo en el *screen* realizado en este trabajo (Figura 31).

Egl forma con Bicaudal D (BicD) un complejo que promueve la localización de ARNm y proteínas esenciales para el establecimiento de la polaridad en la oogénesis y embriogénesis temprana de *Drosophila* (Riechmann and Ephrussi 2001). El transporte polarizado en muchos tipos de células dirige el movimiento de ARNm y proteínas desde su sitio de síntesis hasta su lugar de acción. En este proceso de transporte está involucrado el complejo motor de microtúbulos citoplasmático de Dineína. Egl se asocia tanto con BicD mediante un dominio en su extremo N-terminal (Mach and Lehmann 1997) como con la cadena ligera de Dineína (Dlc) mediante un dominio en su extremo C-terminal (Navarro, Puthalakath et al. 2004). Por tanto Egl-BicD forman un complejo con la carga (ARNm o proteínas) y la interacción de Egl con Dlc hace que se produzca el transporte de la carga mediada por microtúbulos de dineína.

Por último, *quaking related 58E-3* y *yantar* también son proteínas de unión a ARN implicadas en distintos pasos de la expresión génica que han sido identificados como modificadores del modelo de DM1 aquí presentado (Figuras 32 y 37).

El gen *qkr58E-3* forma parte de una lista de 10 genes descritos hasta ahora en *Drosophila* que contienen dominios maxi-KH de unión a ARN conocidos como genes relacionados con *quaking* por su homología con el gen *quaking* de ratón (Fyrberg, Becker et al. 1998). Pertenecen a la familia de proteínas STAR (signal transduction and RNA activation) con capacidad de unión a ARN por lo que probablemente controlan algún paso de la expresión génica (Vernet and Artzt 1997).

Ytr codifica para una proteína con un dominio rico en argininas que se encuentra en proteínas de unión a ARN y factores de *splicing*, y con un dominio único e el extremo C-terminal de función desconocida que muestra un alto grado de conservación entre los ortólogos de Ytr identificados en otras especies (Sinenko, Kim et al. 2004). Las mutaciones de falta de función en la secuencia de la proteína causan alteraciones en la hematopoyesis y fallos en el crecimiento de los discos imaginales y

del cerebro de *Drosophila* (Sinenko, Kim et al. 2004). El análisis de la secuencia de la proteína muestra que en la mitad N-terminal tiene dos bloques con repeticiones que tienen homología con dominios que se encuentran en varios factores de *splicing* SR (serina/arginina). Estas repeticiones podrían mediar en interacciones con ARN o en interacciones proteína-proteína (Sinenko, Kim et al. 2004). Por otro lado, el extremo C-terminal es el que muestra más conservación entre los ortólogos pero no tienen homología con nada que ese pueda encontrar en las bases de datos y por tanto la función es desconocida (Sinenko, Kim et al. 2004). Por tanto, aunque aún se desconoce exactamente la función de Ytr es probable que sea un regulador de crecimiento y diferenciación mediante unión a ácidos nucleicos ya sea directa o indirectamente (Sinenko, Kim et al. 2004).

6.4. Un *screen* genético no dirigido identifica nuevas rutas implicadas en la DM1

En el *screen* genético con elementos P hemos identificado una serie de genes que podrían ser útiles para el estudio de la patología en la DM1. De los genes obtenidos como potenciadores del fenotipo hemos descubierto nuevas rutas no descritas previamente en la patología de la DM1 como genes de la cascada de transducción de señales, componentes del citoesqueleto o de la maquinaria de degradación proteica. Aunque en el futuro se procederá a la caracterización de los genes obtenidos que potencian el fenotipo de ojo, en este trabajo nos concentramos en el único gen supresor encontrado, *skuld*.

Se ha observado supresión del fenotipo de ojo inducido por la expresión de (CUG)₄₈₀ con 4 alelos distintos de falta de función del gen *skuld* (Figura 39). El gen *skuld* codifica para el homólogo de *Drosophila* de la proteína humana TRAP240 (Treisman 2001). Esta proteína es un componente de un gran complejo co-activador de transcripción homólogo del complejo Mediator de levaduras (Kim, Bjorklund et al. 1994). La regulación de la transcripción es un proceso complejo que requiere no solo activadores y represores de la transcripción específicos, cuya actividad puede ser modificada por señalizaciones intercelulares, sino que también requiere factores más generales. Uno de estos factores son los complejos remodeladores de la cromatina que controlan el acceso de ciertos factores a las secuencias reguladoras. Otro tipo de complejo, el homólogo del complejo Mediator de levaduras, parece ser importante como co-activador o co-represor, haciendo de nexo de unión entre factores específicos

y la maquinaria transcripcional basal de la ARN polimerasa II (Malik and Roeder 2000). La proteína TRAP240 forma parte de este complejo protéico que consta de unas 25 subunidades siendo TRAP240 una de las más grandes (Malik and Roeder 2000). Las siglas TRAP vienen de Thyroid-hormone-receptor-associated protein ya que fue en estudios relacionados con el receptor de la hormona tiroidea donde primero se purificaron estos complejos (Malik and Roeder 2000). El papel individual de cada uno de los componentes del complejo no se conoce aún, pero de estudios realizados en *Drosophila* con *skuld* se deduce que actúa junto a otra proteína llamada TRAP230 y ambas promueven especificación celular mediante transmisión de señales (Treisman 2001).

Con posterioridad a los experimentos de este trabajo se ha utilizado el modelo de ratón HSA^{LR} (que contiene una expansión de CTGs insertada en la región 3' del gen humano de la alpha actina de músculo esquelético) (Mankodi, Logigian et al. 2000), para demostrar, también *in vivo*, que la sobre-expresión de *Mbnl1* (homólogo de MBNL1 en ratón), mediante transducción del músculo esquelético con un vector viral recombinante adeno-asociado, es capaz de rescatar los fenotipos asociados a la DM1 que presentan los ratones HSA^{LR} de miotonía y fallos en el *splicing* alternativo (Kanadia, Shin et al. 2006). El resultado de este estudio apoya los resultados presentados en este trabajo y añade importancia a los datos de nuestros ensayos de búsqueda de modificadores. El modelo de DM1 de *Drosophila* aquí presentado nos permite encontrar modificadores que, como ocurre con Muscleblind, sean capaces de suprimir los fenotipos asociados a la enfermedad y que también puedan ser utilizados con posterioridad en mamíferos como se ha hecho con Muscleblind. Este tipo de búsquedas son imposibles de realizar en ratones.

7. CONCLUSIONES

1. El modelo de DM1 generado en *Drosophila melanogaster* expresando el triplete expandido (CTG)₄₈₀ reproduce las características patológicas claves de la enfermedad como son la degeneración muscular, formación de fosas nucleares de ARN y fallos en el *splicing* alternativo.
2. La expresión de (CUG)₄₈₀ en *Drosophila* es suficiente para causar fallos en el *splicing* alternativo de los genes *CG6803* y *Rya-r*. *CG6803* sufre un cambio hacia la expresión de isoformas larvarias parecido a lo que ocurren en la DM1 donde los ARNm afectados existen predominantemente como isoformas fetales.
3. Los niveles de MBNL1 y CUG-BP1, proteínas clave en la patogenicidad de la DM1, pueden modular los fenotipos de la enfermedad que se dan en el modelo de DM1 de *Drosophila*. Mostramos por primera vez *in vivo* que la toxicidad inducida por la expresión de CUGs expandidos puede ser suprimida por la sobre-expresión de la proteína MBNL1. Estos resultados apoyan el modelo de ganancia de función de ARN por secuestro de MBNL1 y aumento de la actividad de CUG-BP1.
4. El modelo de DM1 generado en este estudio sirve como herramienta para identificar nuevos genes implicados en la enfermedad cuando es usado para desarrollar *screens* genéticos.
5. Los modificadores descubiertos en rutas no implicados hasta ahora con la DM1 pueden proporcionar nuevas dianas terapéuticas para tratar la enfermedad DM1.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Amack, J. D., A. P. Paguio, et al. (1999). "Cis and trans effects of the myotonic dystrophy (DM) mutation in a cell culture model." Hum Mol Genet **8**(11): 1975-84.
- Anant, S., J. O. Henderson, et al. (2001). "Novel role for RNA-binding protein CUGBP2 in mammalian RNA editing. CUGBP2 modulates C to U editing of apolipoprotein B mRNA by interacting with apobec-1 and ACF, the apobec-1 complementation factor." J Biol Chem **276**(50): 47338-51.
- Artero, R., A. Prokop, et al. (1998). "The muscleblind gene participates in the organization of Z-bands and epidermal attachments of Drosophila muscles and is regulated by Dmef2." Dev Biol **195**(2): 131-43.
- Asano, K., W. C. Merrick, et al. (1997). "The translation initiation factor eIF3-p48 subunit is encoded by int-6, a site of frequent integration by the mouse mammary tumor virus genome." J Biol Chem **272**(38): 23477-80.
- Berul, C. I., C. T. Maguire, et al. (1999). "DMPK dosage alterations result in atrioventricular conduction abnormalities in a mouse myotonic dystrophy model." J Clin Invest **103**(4): R1-7.
- Bomsztyk, K., O. Denisenko, et al. (2004). "hnRNP K: one protein multiple processes." Bioessays **26**(6): 629-38.
- Brand, A. H. and N. Perrimon (1993). "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes." Development **118**(2): 401-15.
- Buj-Bello, A., D. Furling, et al. (2002). "Muscle-specific alternative splicing of myotubularin-related 1 gene is impaired in DM1 muscle cells." Hum Mol Genet **11**(19): 2297-307.
- Charlet, B. N., R. S. Savkur, et al. (2002). "Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing." Mol Cell **10**(1): 45-53.
- Charroux, B., C. Angelats, et al. (1999). "The levels of the bancal product, a Drosophila homologue of vertebrate hnRNP K protein, affect cell proliferation and apoptosis in imaginal disc cells." Mol Cell Biol **19**(11): 7846-56.
- Dahanukar, A., J. A. Walker, et al. (1999). "Smaug, a novel RNA-binding protein that operates a translational switch in Drosophila." Mol Cell **4**(2): 209-18.

- Davis, B. M., M. E. McCurrach, et al. (1997). "Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(14): 7388-93.
- Day, J. W. and L. P. Ranum (2005). "RNA pathogenesis of the myotonic dystrophies." Neuromuscul Disord **15**(1): 5-16.
- Eberhart, C. G., J. Z. Maines, et al. (1996). "Meiotic cell cycle requirement for a fly homologue of human Deleted in Azoospermia." Nature **381**(6585): 783-5.
- Fardaei, M., K. Larkin, et al. (2001). "In vivo co-localisation of MBNL protein with DMPK expanded-repeat transcripts." Nucleic Acids Res **29**(13): 2766-71.
- Fardaei, M., M. T. Rogers, et al. (2002). "Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells." Hum Mol Genet **11**(7): 805-14.
- Faustino, N. A. and T. A. Cooper (2003). "Pre-mRNA splicing and human disease." Genes Dev **17**(4): 419-37.
- Fernandez-Funez, P., M. L. Nino-Rosales, et al. (2000). "Identification of genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration." Nature **408**(6808): 101-6.
- Fortini, M. E. and N. M. Bonini (2000). "Modeling human neurodegenerative diseases in Drosophila: on a wing and a prayer." Trends Genet **16**(4): 161-7.
- Frisch, R., K. R. Singleton, et al. (2001). "Effect of triplet repeat expansion on chromatin structure and expression of DMPK and neighboring genes, SIX5 and DMWD, in myotonic dystrophy." Mol Genet Metab **74**(1-2): 281-91.
- Fyrberg, C., J. Becker, et al. (1998). "A family of Drosophila genes encoding quaking-related maxi-KH domains." Biochem Genet **36**(1-2): 51-64.
- Gavis, E. R. and R. Lehmann (1994). "Translational regulation of nanos by RNA localization." Nature **369**(6478): 315-8.
- Harper, P. S., J. D. Brook, et al. (2001). Myotonic dystrophy. London, Saunders.
- Ho, T. H., D. Bundman, et al. (2005). "Transgenic mice expressing CUG-BP1 reproduce splicing mis-regulation observed in myotonic dystrophy." Hum Mol Genet **14**(11): 1539-47.
- Ho, T. H., B. N. Charlet, et al. (2004). "Muscleblind proteins regulate alternative splicing." Embo J **23**(15): 3103-12.

- Houseley, J. M., Z. Wang, et al. (2005). "Myotonic dystrophy associated expanded CUG repeat muscleblind positive ribonuclear foci are not toxic to *Drosophila*." Hum Mol Genet **14**(6): 873-83.
- Huynh, D. P., M. R. Del Bigio, et al. (1999). "Expression of ataxin-2 in brains from normal individuals and patients with Alzheimer's disease and spinocerebellar ataxia 2." Ann Neurol **45**(2): 232-41.
- Huynh, D. P., K. Figueroa, et al. (2000). "Nuclear localization or inclusion body formation of ataxin-2 are not necessary for SCA2 pathogenesis in mouse or human." Nat Genet **26**(1): 44-50.
- Jacobs, A. E., A. A. Benders, et al. (1990). "The calcium homeostasis and the membrane potential of cultured muscle cells from patients with myotonic dystrophy." Biochim Biophys Acta **1096**(1): 14-9.
- Jansen, G., P. J. Groenen, et al. (1996). "Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice." Nat Genet **13**(3): 316-24.
- Jiang, H., A. Mankodi, et al. (2004). "Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons." Hum Mol Genet **13**(24): 3079-88.
- Johnson, J. M., J. Castle, et al. (2003). "Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays." Science **302**(5653): 2141-4.
- Johnstone, O. and P. Lasko (2001). "Translational regulation and RNA localization in *Drosophila* oocytes and embryos." Annu Rev Genet **35**: 365-406.
- Joiner, M. L. and C. F. Wu (2004). "Nervous system function for the testis RNA-binding protein boule in *Drosophila*." J Neurogenet **18**(1): 341-63.
- Junghans, R. P., A. Ebralidze, et al. (2001). "Does (CUG)_n repeat in DMPK mRNA 'paint' chromosome 19 to suppress distant genes to create the diverse phenotype of myotonic dystrophy? A new hypothesis of long-range cis autosomal inactivation." Neurogenetics **3**(2): 59-67.
- Kanadia, R. N., K. A. Johnstone, et al. (2003). "A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy." Science **302**(5652): 1978-80.
- Kanadia, R. N., J. Shin, et al. (2006). "Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(31): 11748-53.

- Kim, Y. J., S. Bjorklund, et al. (1994). "A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II." Cell **77**(4): 599-608.
- Kimura, T., M. Nakamori, et al. (2005). "Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in myotonic dystrophy type 1." Hum Mol Genet **14**(15): 2189-200.
- Klesert, T. R., D. H. Cho, et al. (2000). "Mice deficient in Six5 develop cataracts: implications for myotonic dystrophy." Nat Genet **25**(1): 105-9.
- Klinkerfuss, G. H. (1967). "An electron microscopic study of myotonic dystrophy." Arch Neurol **16**(2): 181-93.
- Kozlov, G., J. F. Trempe, et al. (2001). "Structure and function of the C-terminal PABC domain of human poly(A)-binding protein." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(8): 4409-13.
- Ladd, A. N., N. Charlet, et al. (2001). "The CELF family of RNA binding proteins is implicated in cell-specific and developmentally regulated alternative splicing." Mol Cell Biol **21**(4): 1285-96.
- Ladd, A. N., M. G. Stenberg, et al. (2005). "Dynamic balance between activation and repression regulates pre-mRNA alternative splicing during heart development." Dev Dyn **233**(3): 783-93.
- Laporte, J., F. Blondeau, et al. (2001). "The myotubularin family: from genetic disease to phosphoinositide metabolism." Trends Genet **17**(4): 221-8.
- Laporte, J., L. J. Hu, et al. (1996). "A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast." Nat Genet **13**(2): 175-82.
- Lehmann-Horn, F. and K. Jurkat-Rott (1999). "Voltage-gated ion channels and hereditary disease." Physiol Rev **79**(4): 1317-72.
- Leroy, O., J. Wang, et al. (2006). "Brain-specific change in alternative splicing of Tau exon 6 in myotonic dystrophy type 1." Biochim Biophys Acta **1762**(4): 460-7.
- Lewis, B. P., R. E. Green, et al. (2003). "Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(1): 189-92.
- Lin, X., J. W. Miller, et al. (2006). "Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy." Hum Mol Genet **15**(13): 2087-97.

- Liquori, C. L., K. Ricker, et al. (2001). "Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9." Science **293**(5531): 864-7.
- Ludatscher, R. M., H. Kerner, et al. (1978). "Myotonia dystrophica with heart involvement: an electron microscopic study of skeletal, cardiac, and smooth muscle." J Clin Pathol **31**(11): 1057-64.
- Mach, J. M. and R. Lehmann (1997). "An Egalitarian-BicaudalD complex is essential for oocyte specification and axis determination in Drosophila." Genes Dev **11**(4): 423-35.
- Machuca-Tzili, L., D. Brook, et al. (2005). "Clinical and molecular aspects of the myotonic dystrophies: a review." Muscle Nerve **32**(1): 1-18.
- Mahadevan, M. S., R. S. Yadava, et al. (2006). "Reversible model of RNA toxicity and cardiac conduction defects in myotonic dystrophy." Nat Genet **38**(9): 1066-70.
- Maines, J. Z. and S. A. Wasserman (1999). "Post-transcriptional regulation of the meiotic Cdc25 protein Twine by the Dazl orthologue Boule." Nat Cell Biol **1**(3): 171-4.
- Malik, S. and R. G. Roeder (2000). "Transcriptional regulation through Mediator-like coactivators in yeast and metazoan cells." Trends Biochem Sci **25**(6): 277-83.
- Mangus, D. A., M. C. Evans, et al. (2003). "Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression." Genome Biol **4**(7): 223.
- Mankodi, A., E. Logigian, et al. (2000). "Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat." Science **289**(5485): 1769-73.
- Mankodi, A., M. P. Takahashi, et al. (2002). "Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of CIC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy." Mol Cell **10**(1): 35-44.
- Mankodi, A., P. Teng-Umnuay, et al. (2003). "Ribonuclear inclusions in skeletal muscle in myotonic dystrophy types 1 and 2." Ann Neurol **54**(6): 760-8.
- Mankodi, A., C. R. Urbinati, et al. (2001). "Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2." Hum Mol Genet **10**(19): 2165-70.
- Matunis, M. J., E. L. Matunis, et al. (1992). "Isolation of hnRNP complexes from Drosophila melanogaster." J Cell Biol **116**(2): 245-55.

- Meola, G., V. Sansone, et al. (1996). "A family with an unusual myotonic and myopathic phenotype and no CTG expansion (proximal myotonic myopathy syndrome): a challenge for future molecular studies." Neuromuscul Disord **6**(3): 143-50.
- Michalowski, S., J. W. Miller, et al. (1999). "Visualization of double-stranded RNAs from the myotonic dystrophy protein kinase gene and interactions with CUG-binding protein." Nucleic Acids Res **27**(17): 3534-42.
- Miller, J. W., C. R. Urbinati, et al. (2000). "Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy." Embo J **19**(17): 4439-48.
- Morrone, A., E. Pegoraro, et al. (1997). "RNA metabolism in myotonic dystrophy: patient muscle shows decreased insulin receptor RNA and protein consistent with abnormal insulin resistance." J Clin Invest **99**(7): 1691-8.
- Mukhopadhyay, D., C. W. Houchen, et al. (2003). "Coupled mRNA stabilization and translational silencing of cyclooxygenase-2 by a novel RNA binding protein, CUGBP2." Mol Cell **11**(1): 113-26.
- Napierala, M. and W. J. Krzyzosiak (1997). "CUG repeats present in myotonin kinase RNA form metastable "slippery" hairpins." J Biol Chem **272**(49): 31079-85.
- Navarro, C., H. Puthalakath, et al. (2004). "Eglatimer binds dynein light chain to establish oocyte polarity and maintain oocyte fate." Nat Cell Biol **6**(5): 427-35.
- Paillard, L., F. Omilli, et al. (1998). "EDEN and EDEN-BP, a cis element and an associated factor that mediate sequence-specific mRNA deadenylation in *Xenopus* embryos." Embo J **17**(1): 278-87.
- Parks, A. L., K. R. Cook, et al. (2004). "Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the *Drosophila melanogaster* genome." Nat Genet **36**(3): 288-92.
- Philips, A. V., L. T. Timchenko, et al. (1998). "Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy." Science **280**(5364): 737-41.
- Phillips, M. F. and P. S. Harper (1997). "Cardiac disease in myotonic dystrophy." Cardiovasc Res **33**(1): 13-22.
- Portwood, M. M., J. J. Wicks, et al. (1986). "Intellectual and cognitive function in adults with myotonic muscular dystrophy." Arch Phys Med Rehabil **67**(5): 299-303.

- Qiu, F., S. Brendel, et al. (2005). "Myofilin, a protein in the thick filaments of insect muscle." J Cell Sci **118**(Pt 7): 1527-36.
- Ranum, L. P., P. F. Rasmussen, et al. (1998). "Genetic mapping of a second myotonic dystrophy locus." Nat Genet **19**(2): 196-8.
- Reddy, S., D. B. Smith, et al. (1996). "Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy." Nat Genet **13**(3): 325-35.
- Ricker, K., M. C. Koch, et al. (1994). "Proximal myotonic myopathy: a new dominant disorder with myotonia, muscle weakness, and cataracts." Neurology **44**(8): 1448-52.
- Ricker, K., M. C. Koch, et al. (1995). "Proximal myotonic myopathy. Clinical features of a multisystem disorder similar to myotonic dystrophy." Arch Neurol **52**(1): 25-31.
- Riechmann, V. and A. Ephrussi (2001). "Axis formation during *Drosophila* oogenesis." Curr Opin Genet Dev **11**(4): 374-83.
- Rorth, P. (1996). "A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(22): 12418-22.
- Rubinsztein, J. S., D. C. Rubinsztein, et al. (1997). "Mild myotonic dystrophy is associated with memory impairment in the context of normal general intelligence." J Med Genet **34**(3): 229-33.
- Sarkar, P. S., B. Appukuttan, et al. (2000). "Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts." Nat Genet **25**(1): 110-4.
- Satterfield, T. F., S. M. Jackson, et al. (2002). "A *Drosophila* homolog of the polyglutamine disease gene SCA2 is a dosage-sensitive regulator of actin filament formation." Genetics **162**(4): 1687-702.
- Satterfield, T. F. and L. J. Pallanck (2006). "Ataxin-2 and its *Drosophila* homolog, ATX2, physically assemble with polyribosomes." Hum Mol Genet **15**(16): 2523-32.
- Savkur, R. S., A. V. Philips, et al. (2001). "Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy." Nat Genet **29**(1): 40-7.
- Seino, S. and G. I. Bell (1989). "Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA." Biochem Biophys Res Commun **159**(1): 312-6.

- Sergeant, N., B. Sablonniere, et al. (2001). "Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1." Hum Mol Genet **10**(19): 2143-55.
- Seznec, H., O. Agbulut, et al. (2001). "Mice transgenic for the human myotonic dystrophy region with expanded CTG repeats display muscular and brain abnormalities." Hum Mol Genet **10**(23): 2717-26.
- Shibata, H., D. P. Huynh, et al. (2000). "A novel protein with RNA-binding motifs interacts with ataxin-2." Hum Mol Genet **9**(9): 1303-13.
- Shulman, J. M., L. M. Shulman, et al. (2003). "From fruit fly to bedside: translating lessons from Drosophila models of neurodegenerative disease." Curr Opin Neurol **16**(4): 443-9.
- Sinenko, S. A., E. K. Kim, et al. (2004). "Yantar, a conserved arginine-rich protein is involved in Drosophila hemocyte development." Dev Biol **273**(1): 48-62.
- Smibert, C. A., Y. S. Lie, et al. (1999). "Smaug, a novel and conserved protein, contributes to repression of nanos mRNA translation in vitro." Rna **5**(12): 1535-47.
- Smibert, C. A., J. E. Wilson, et al. (1996). "smaug protein represses translation of unlocalized nanos mRNA in the Drosophila embryo." Genes Dev **10**(20): 2600-9.
- St Johnston, D. (2002). "The art and design of genetic screens: Drosophila melanogaster." Nat Rev Genet **3**(3): 176-88.
- Sullivan, K. M., K. Scott, et al. (2000). "The ryanodine receptor is essential for larval development in Drosophila melanogaster." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 5942-7.
- Takahashi, N., N. Sasagawa, et al. (2000). "The CUG-binding protein binds specifically to UG dinucleotide repeats in a yeast three-hybrid system." Biochem Biophys Res Commun **277**(2): 518-23.
- Taneja, K. L., M. McCurrach, et al. (1995). "Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues." J Cell Biol **128**(6): 995-1002.
- Thornton, C. A., R. C. Griggs, et al. (1994). "Myotonic dystrophy with no trinucleotide repeat expansion." Ann Neurol **35**(3): 269-72.
- Timchenko, L. T., J. W. Miller, et al. (1996). "Identification of a (CUG)_n triplet repeat RNA-binding protein and its expression in myotonic dystrophy." Nucleic Acids Res **24**(22): 4407-14.

- Timchenko, L. T., N. A. Timchenko, et al. (1996). "Novel proteins with binding specificity for DNA CTG repeats and RNA CUG repeats: implications for myotonic dystrophy." Hum Mol Genet **5**(1): 115-21.
- Timchenko, N. A., Z. J. Cai, et al. (2001). "RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1." J Biol Chem **276**(11): 7820-6.
- Timchenko, N. A., P. Iakova, et al. (2001). "Molecular basis for impaired muscle differentiation in myotonic dystrophy." Mol Cell Biol **21**(20): 6927-38.
- Timchenko, N. A., R. Patel, et al. (2004). "Overexpression of CUG triplet repeat-binding protein, CUGBP1, in mice inhibits myogenesis." J Biol Chem **279**(13): 13129-39.
- Timchenko, N. A., A. L. Welm, et al. (1999). "CUG repeat binding protein (CUGBP1) interacts with the 5' region of C/EBPbeta mRNA and regulates translation of C/EBPbeta isoforms." Nucleic Acids Res **27**(22): 4517-25.
- Tonegawa, S., J. Z. Tsien, et al. (1996). "Hippocampal CA1-region-restricted knockout of NMDAR1 gene disrupts synaptic plasticity, place fields, and spatial learning." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **61**: 225-38.
- Treisman, J. (2001). "Drosophila homologues of the transcriptional coactivation complex subunits TRAP240 and TRAP230 are required for identical processes in eye-antennal disc development." Development **128**(4): 603-15.
- Tsien, J. Z., P. T. Huerta, et al. (1996). "The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory." Cell **87**(7): 1327-38.
- Udd, B., R. Krahe, et al. (1997). "Proximal myotonic dystrophy--a family with autosomal dominant muscular dystrophy, cataracts, hearing loss and hypogonadism: heterogeneity of proximal myotonic syndromes?" Neuromuscul Disord **7**(4): 217-28.
- Vernet, C. and K. Artzt (1997). "STAR, a gene family involved in signal transduction and activation of RNA." Trends Genet **13**(12): 479-84.
- Vialettes, B., J. Pouget, et al. (1986). "Mechanism and significance of insulin resistance in myotonic dystrophy." Horm Metab Res **18**(6): 395-9.
- Wang, C. and R. Lehmann (1991). "Nanos is the localized posterior determinant in Drosophila." Cell **66**(4): 637-47.

- Westerlaken, J. H., C. E. Van der Zee, et al. (2003). "The DMWD protein from the myotonic dystrophy (DM1) gene region is developmentally regulated and is present most prominently in synapse-dense brain areas." Brain Res **971**(1): 116-27.
- Xu, E. Y., D. F. Lee, et al. (2003). "Human BOULE gene rescues meiotic defects in infertile flies." Hum Mol Genet **12**(2): 169-75.
- Xu, E. Y., F. L. Moore, et al. (2001). "A gene family required for human germ cell development evolved from an ancient meiotic gene conserved in metazoans." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7414-9.
- Yano, M., H. J. Okano, et al. (2005). "Involvement of Hu and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in neuronal differentiation through p21 mRNA post-transcriptional regulation." J Biol Chem **280**(13): 12690-9.
- Ye, B., C. Petritsch, et al. (2004). "Nanos and Pumilio are essential for dendrite morphogenesis in Drosophila peripheral neurons." Curr Biol **14**(4): 314-21.
- Zaessinger, S., I. Busseau, et al. (2006). "Oskar allows nanos mRNA translation in Drosophila embryos by preventing its deadenylation by Smaug/CCR4." Development.
- Zoghbi, H. Y. and J. Botas (2002). "Mouse and fly models of neurodegeneration." Trends Genet **18**(9): 463-71.

MBNL1 and CUGBP1 modify expanded CUG-induced toxicity in a *Drosophila* model of myotonic dystrophy type 1

María de Haro^{1,3}, Ismael Al-Ramahi^{1,3}, Beatrice De Gouyon¹, Lubna Ukani¹, Alberto Rosa^{1,†}, Nuno André Faustino², Tetsuo Ashizawa⁴, Thomas A. Cooper² and Juan Botas^{1,*}

¹Department of Molecular and Human Genetics and ²Departments of Pathology and Molecular and Cellular Biology, Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, Houston, TX 77030, USA, ³Departamento de Biología, Facultad de Ciencias-UAM, Madrid 28049, Spain and ⁴Department of Neurology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX 77555, USA

Received March 20, 2006; Revised and Accepted May 19, 2006

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is a neuromuscular disorder caused by a CTG expansion in the 3' UTR of the dystrophin myotonic protein kinase (*DMPK*) gene. It has been hypothesized that the pathogenesis in DM1 is triggered by a toxic gain of function of the expanded *DMPK* RNA. This expanded RNA is retained in nuclear foci where it sequesters and induces alterations in the levels of RNA-binding proteins (RNA-BP). To model DM1 and study the implication of RNA-BP in CUG-induced toxicity, we have generated a *Drosophila* DM1 model expressing a non-coding mRNA containing 480 interrupted CUG repeats; i.e. [(CUG)₂₀CUCGA]₂₄. This (iCUG)₄₈₀ transcript accumulates in nuclear foci and its expression leads to muscle wasting and degeneration in *Drosophila*. We also report that altering the levels of two RNA-BP known to be involved in DM1 pathogenesis, MBNL1 and CUGBP1, modify the (iCUG)₄₈₀ degenerative phenotypes. Expanded CUG-induced toxicity in *Drosophila* is suppressed when MBNL1 expression levels are increased, and enhanced when MBNL1 levels are reduced. In addition, (iCUG)₄₈₀ also causes a decrease in the levels of soluble MBNL1 that is sequestered in the CUG-containing nuclear foci. In contrast, increasing the levels of CUGBP1 worsens (iCUG)₄₈₀-induced degeneration even though CUGBP1 distribution is not altered by the expression of the expanded triplet repeat. Our data supports a mechanism for DM1 pathogenesis in which decreased levels of MBNL and increased levels of CUGBP1 mediate the RNA-induced toxicity observed in DM1. Perhaps more importantly, they also provide proof of the principle that CUG-induced muscle toxicity can be suppressed.

INTRODUCTION

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is the most common form of adult onset muscular dystrophy with an incidence of one in 8000 births. Unlike other neuromuscular diseases, DM1 is multisystemic and, in addition to myotonia and muscle degeneration, patients show the presence of cataracts, cardiac conduction defects, insulin resistance, sleeping disorders and testicular atrophy (1).

DM1 is caused by a triple repeat expansion in the 3' UTR of the dystrophin myotonic protein kinase (*DMPK*) gene (2–4).

While normal individuals have as many as 30 CTG repeats, DM1 patients carry a larger number of repeats ranging from 50 to thousands. The severity of the disease and the age of onset correlates with the number of repeats. Patients with adult onsets show milder symptoms and have less than 100 repeats, juvenile onset DM1 patients carry as many as 500 repeats and congenital cases usually have around a thousand CTG repeats (1).

According to one hypothesis, DM1 is a consequence of *DMPK* haploinsufficiency (5–7). Another hypothesis postulated that DM1 is a consequence of alterations in the levels

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +1 713 7985937; Fax: +1 713 7985386; Email: jbotas@bcm.tmc.edu

†Present address: Laboratorio de Neurogenética, Instituto de Investigaciones Médicas Mercedes y Martín Ferreyra, Córdoba 5016, Argentina.

of *DMPK* flanking genes (8,9). However, transgenic mice models generated to test these hypotheses failed to reproduce most of the symptoms of the disease (10–14).

Myotonic dystrophy type 2 (DM2), a disease with similar clinical manifestations, maps to a different locus (15) and is also caused by an untranslated repeat expansion (16). These findings pointed towards an RNA gain-of-function mechanism of pathogenesis for the expanded repeats.

Transgenic mice, expressing expanded CTG repeats in muscle tissue under the control of an actin promoter, display myotonia and some of the histopathological abnormalities of the DM1-affected muscle; i.e. central nuclei and variability in fibre size (17). These results demonstrated that the expanded repeats by themselves could account for at least some of the disease features independent of the *DMPK* locus.

The expanded transcripts containing CUG repeats form a secondary structure (18,19), accumulate in the nucleus in the form of nuclear foci (20) and sequester RNA-binding proteins (RNA-BP) (18,21,22). Several RNA-BP have been implicated in the disease including muscleblind-like (MBNL) proteins and CUG-binding protein (CUGBP) (21,23). MBNL proteins are homologous to *Drosophila* muscleblind (Mbl) proteins necessary for photoreceptor and muscle differentiation (24,25). MBNL and CUGBP have been identified as antagonistic splicing regulators of transcripts affected in DM1 such as cardiac troponin T (cTNT), insulin receptor (IR) and muscle-specific chloride channel (ClC-1) (26–30).

MBNL proteins co-localize with the expanded CUG-containing foci (21,22,31–35). A *muscleblind* knockout mouse model in which only the CUG-binding isoforms were eliminated shows myotonia, cataracts, aberrant splicing of *Clen 1* and abnormal muscle histology (26). These data point towards the depletion of muscleblind as an important mechanism in expanded CUG-induced DM1 pathogenesis.

Two different transgenic mouse lines have been generated that overexpress CUGBP1 either in skeletal muscle alone (36), or in both heart and skeletal muscles (27). These mice show abnormal muscle development and muscular dystrophy and, one of them (27) also shows alternative splicing misregulation of transcripts known to be affected in DM1.

Here, we describe a *Drosophila* model of DM1 that shows degenerative phenotypes in muscle and eye tissue as well as key histopathological features of the DM1. These features include accumulation of the expanded transcripts in nuclear foci and their co-localization with muscleblind protein. We used this model to further test the hypothesis that DM1 pathogenesis is caused by the depletion of muscleblind. We show that reduced levels of muscleblind aggravate and, more importantly, overexpression suppresses the muscle and eye phenotypes of DM1 flies.

RESULTS

Expanded CUG repeats cause eye and muscle degeneration and accumulate in nuclear foci in *Drosophila*

To test the RNA gain-of-function hypothesis, and to gain insight into the causative mechanisms behind the DM1

pathology, we generated flies expressing a non-coding mRNA containing 480 interrupted CUG repeats [(iCUG)₄₈₀] made of the sequence: [(CUG)₂₀CUCGA]₂₄. The GAL4/UAS system (37) was used to control the spatial and temporal expression of the (iCUG)₄₈₀ mRNA.

Expression of (iCUG)₄₈₀ in the eye causes disorganization and fusion of the ommatidia as well as loss and duplication of inter-ommatidial bristles. Eyes expressing the (iCUG)₄₈₀ mRNA are also smaller than controls (Fig. 1A–D).

To investigate the effect of (iCUG)₄₈₀ in somatic muscles, we expressed (iCUG)₄₈₀ using a muscle-specific myosin heavy chain promoter. A hallmark of DM1 pathology is the accumulation of expanded CUG-containing RNA in nuclear foci. We monitored RNA accumulation using a Cy3 labelled anti-CUG probe. We observe the foci formation in the nuclei of third instar larvae muscles (Fig. 1F). No nuclear foci are detected in muscles from wild-type animals (Fig. 1E) or animals expressing (CUG)₂₀ (data not shown).

We also investigated whether the expression of (iCUG)₄₈₀ leads to toxicity in the *Drosophila* muscles. One-day-old adult animals are unable to fly but present no histological evidence of muscle degeneration (data not shown). Ten-day-old (iCUG)₄₈₀ flies show degeneration and vacuolization of the indirect flight muscles (IFM) (Fig. 1H), and loss of the structure of muscle fibres (compare Fig. 1K with J). In 20-day-old (iCUG)₄₈₀ flies, the wasting of the IFM is more severe showing a diffuse matrix, the structure of the fibres has been lost and the nuclei appear dispersed (Fig. 1I and L). In contrast, control flies that do not express CUG repeats (Fig. 1G), or expressing (CUG)₂₀ or (CUG)₂₀₀ (Supplementary Material, Fig. S1) show no muscle phenotype.

Therefore, expression of (iCUG)₄₈₀ causes IFM dysfunction and progressive muscle degeneration. This degenerative phenotype is also evident by staining dissected *Drosophila* adult IFM with phalloidin that labels actin in the muscle fibres (Fig. 1M and N).

MBNL1 overexpression suppresses (iCUG)₄₈₀-induced muscle toxicity

Because MBNL proteins have been implicated in DM1 pathogenesis (21,26,31), we investigated whether altering the levels of muscleblind proteins modulates (iCUG)₄₈₀-induced toxicity. Reduction of muscleblind levels by means of a heterozygous loss-of-function mutation in muscleblind (*mbl*) aggravates the (iCUG)₄₈₀ eye phenotype increasing ommatidial disorganization/fusion and eye size reduction (compare Fig. 2A and C). Eyes from control flies carrying the same *mbl* mutation but no (iCUG)₄₈₀ repeats are normal (Supplementary Material, Fig. S2). These results concur with the muscleblind knockout mouse (26) and support the validity of the *Drosophila* model.

To further test the hypothesis that the (iCUG)₄₈₀ phenotypes are caused by titration and loss of function of muscleblind protein, we investigated the consequences of increasing its levels. We generated flies to express a human muscleblind transgene (*MBNL1*) under control of the GAL4/UAS system.

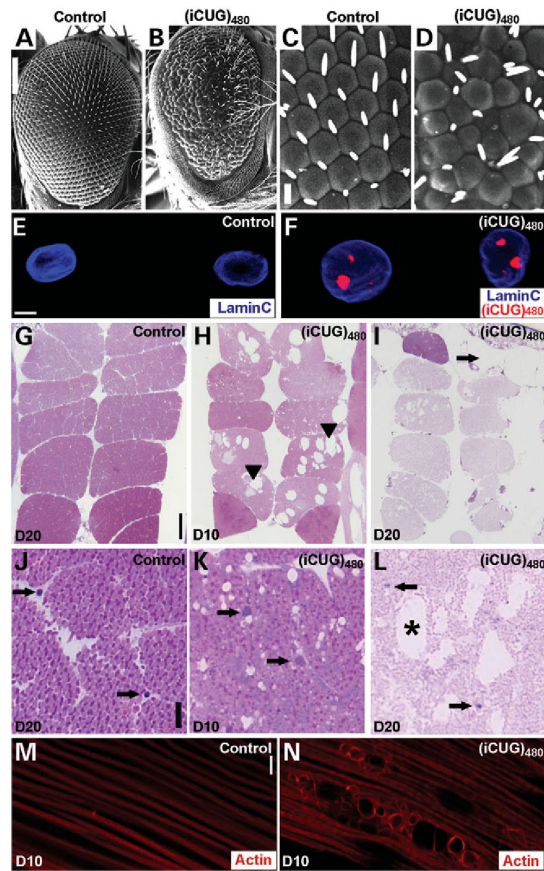


Figure 1. Expression of (iCUG)₄₈₀ in *Drosophila* causes eye and muscle degeneration and accumulation of expanded transcripts in nuclear foci. (A–D) Scanning electron-microscope (SEM) eye images from control flies or flies expressing (iCUG)₄₈₀. Control eyes show the normal organization of ommatidia and inter-ommatidial bristles (A and C). Expression of (iCUG)₄₈₀ causes disorganization of the ommatidia and inter-ommatidial bristles, and reduction of the eye size (B and D). (E and F) *In situ* hybridization in larval muscles using a Cy3-labelled GAC PNA probe of control flies (E) or flies expressing (iCUG)₄₈₀ (F). Muscles were stained with anti-laminC (blue) to visualize the nuclei. (iCUG)₄₈₀ repeats accumulate in nuclear foci (red) in muscle cells of (iCUG)₄₈₀ larvae. (G–L) Transversal resin sections of adult IFM of control flies or flies expressing (iCUG)₄₈₀ at different ages. At day 20, control flies show normal organization of the IFM (G) and the muscle fibres are well structured. Note the nuclei located in the periphery of muscle fibres, arrows in (J). Ten days after eclosion, animals expressing (iCUG)₄₈₀ in the IFM show vacuolization (arrowheads) and muscle disorganization (H). Higher magnification shows loss of fibre organization (arrows point nuclei, K). At 20 days of age, muscle degeneration and wasting progresses, the density of myofibrils per muscle decreases and some muscles are absent (arrow, I). The loss of muscle fibre organization and vacuolization (asterisk) is enhanced (arrows point nuclei, L). (M and N) Phalloidin staining of IFM in the adult thorax of control flies or flies expressing the (iCUG)₄₈₀. At 10 days of age, control flies show normal actin filaments (M). Flies expressing (iCUG)₄₈₀ at day 10 show vacuolization of the tissue (N). Scale bars: (A and B) 100 μ m, (C and D) 10 μ m, (E and F) 5 μ m, (G–I) 50 μ m, (J–L) 10 μ m. (M and N) 50 μ m. Genotypes are A, C: w; *gmr-GAL4/UAS-LacZ*; +; B, D: w; *gmr-GAL4/UAS-LacZ*; UAS-(iCUG)₄₈₀[M5T]/+; E, G, J, M: w; UAS-LacZ/+; *Mhc-GAL4*/+; F, H, I, K, L, N: w; UAS-LacZ/+; *Mhc-GAL4*/UAS-(iCUG)₄₈₀[M5T].

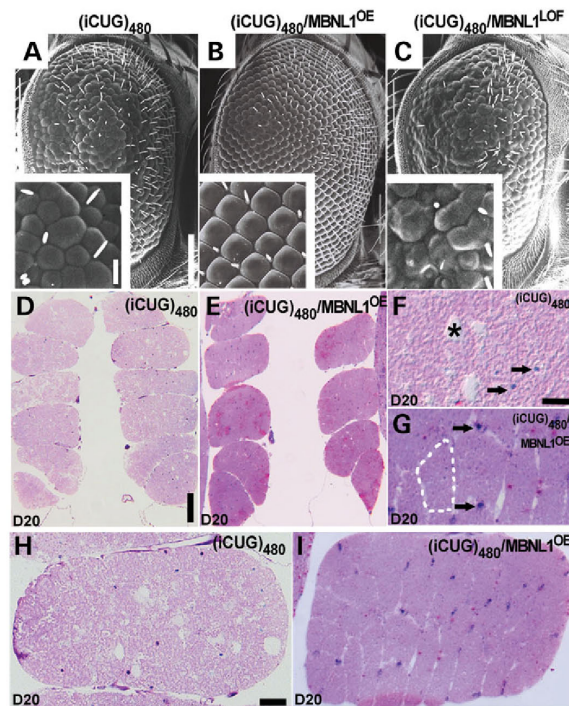


Figure 2. Modification of (iCUG)₄₈₀-induced phenotypes by muscleblind. (A–C) SEM eye images from control flies expressing (iCUG)₄₈₀, (iCUG)₄₈₀ and MBNL1, or (iCUG)₄₈₀ and also carrying a heterozygous mutation in the *Drosophila muscleblind* gene. Flies expressing (iCUG)₄₈₀ and a control transgene show ommatidial disorganization and fusion, and eye size reduction (A). This phenotype is suppressed by MBNL1 overexpression (B). The (iCUG)₄₈₀ eye phenotype is enhanced in animals carrying a heterozygous loss-of-function mutation in *muscleblind* (C). This mutation by itself does not cause an abnormal eye phenotype (see Supplementary Material Fig. S2). (D–I) Transversal semi-thin sections of adult IFM (iCUG)₄₈₀ control flies, or (iCUG)₄₈₀ flies also expressing MBNL1. Control 20-day-old (iCUG)₄₈₀ flies show obvious IFM muscle pathology (D, F and H) that is suppressed by expression of an MBNL1 transgene (E, G and I). Note that the fibres are well organized and the density of myofibril per muscle fibre is higher in the MBNL1-rescued flies (dots in G outline a well-structured muscle fibre) as compared with (iCUG)₄₈₀ controls where there is vacuolization (asterisk, the structure of the fibres has been lost and the nuclei appear dispersed in the matrix (F). Arrows point to nuclei in F and G. Scale bars: (A–C) 100 μ m (insets 10 μ m), (D and E) 50 μ m, (F–I) 10 μ m. Genotypes are A: w; *gmr-GAL4/UAS-LacZ*; UAS-(iCUG)₄₈₀[M5T]/+; B: w; *gmr-GAL4/UAS-MBNL1*[M10M]; UAS-(iCUG)₄₈₀[M5T]/+; C: w; *gmr-GAL4/mb1^{P1514}* (4); UAS-(iCUG)₄₈₀[M5T]/+ (D–I): D, F, H: w; UAS-LacZ/+; *Mhc-GAL4*/(iCUG)₄₈₀[M5T]/+; E, G, I: w; UAS-MBNL1[M10M]/+; *Mhc-GAL4*/UAS-(iCUG)₄₈₀[M5T].

As shown in Figure 2B, overexpression of muscleblind dramatically suppresses the (iCUG)₄₈₀ eye phenotypes (size and organization of the ommatidia).

Next we investigated whether MBNL1 is able to rescue the (iCUG)₄₈₀ somatic muscle phenotype. We examined the muscles of 20-day-old flies co-expressing (iCUG)₄₈₀ and human MBNL1. As shown in Figure 2D, F and H, the IFM from (iCUG)₄₈₀ flies show severe disorganization of the muscle fibres; they also have randomly arranged myofibrils and a diffuse matrix with vacuolization and dispersed

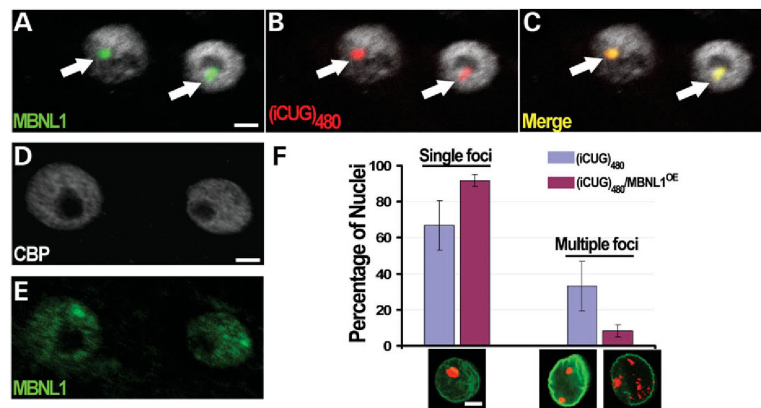


Figure 3. Co-localization of MBNL1 protein with the CUG-containing nuclear foci. (A–C) Images of nuclei from larval somatic muscle co-expressing MBNL1 and (iCUG)₄₈₀ after immunofluorescence and *in situ* hybridization. MBNL1 protein is detected in muscle nuclei when stained with an antibody against MBNL1 (A, white arrows, green). The (iCUG)₄₈₀ transcripts are also visualized in the form of nuclear foci after *in situ* hybridization (B, white arrows, red). Both MBNL1 and (iCUG)₄₈₀ RNA co-localize when the images are merged (C, white arrows, yellow). Muscles are also stained with anti-CBP antibody to visualize the nuclei (white). (D–E) Images of nuclei from larval somatic muscle expressing MBNL1 but no (iCUG)₄₈₀ after immunofluorescence. Anti-CBP antibody revealing nuclei outline (D, white), MBNL1 signal shown in green (E). (F) Comparative quantification of nuclei with single versus multiple foci in flies expressing (iCUG)₄₈₀ alone, or together with MBNL1. Images below the chart illustrate the types of nuclear foci found; no nucleus of any genotype was found without at least one foci. Notice that co-expression of MBNL1 together with (iCUG)₄₈₀ causes an overall decrease in the number of nuclei with multiple foci when compared with the repeats alone. Error bars represent standard deviation. Data was analyzed using Student's *t* ($P = 0.006$ in both groups). Total muscle nuclei (~200 per larva) from four to five larvae per genotype were analyzed. Scale bar: (A–F) 5 μ m. Genotypes are A–C, F: w; UAS-MBNL1[M10M]/+; Mhc-GAL4/UAS-(iCUG)₄₈₀[MST]; D–E: w; UAS-MBNL1[M10M]/+; Mhc-GAL4/+.

nuclei. In contrast, the muscles from (iCUG)₄₈₀ flies over-expressing MBNL1 at appropriate levels show little or no vacuolization (Fig. 2E and I), have a well-defined myofibril matrix (Fig. 2G) and the IFM are well structured in muscle fibres with peripherally located nuclei (Fig. 2G and I). Note also that the rescued muscle in Figure 2E, G and I is more intensely stained than the control muscle in Figure 2D, F and H because of the higher density of the tissue. The muscle phenotype in (iCUG)₄₈₀ flies is 100% penetrant, and we also observed rescue in every (iCUG)₄₈₀ animal also over-expressing MBNL1. In addition, we quantified the rescuing ability of MBNL1 overexpression by counting the number of normal versus abnormal individual IFM. In 20-day-old (iCUG)₄₈₀ flies, only five out of 35 (14.3%) IFM had normal appearance, whereas in (iCUG)₄₈₀ flies over-expressing MBNL1 of the same age, 60 out of 67 (89.5%) appeared normal.

Interestingly, high expressing MBNL1 transgenic lines show a muscle phenotype in the absence of (iCUG)₄₈₀ (data not shown) suggesting that steady state levels of MBNL1 are important.

Because MBNL1 localizes to CUG nuclear foci in DM1 cells (21,22,31), we monitored MBNL1 distribution in the somatic muscle of (iCUG)₄₈₀ flies. MBNL1 presents a diffuse nuclear distribution in the absence of (iCUG)₄₈₀ expression (Fig. 3D and E). In contrast, MBNL1 localizes to nuclear foci in muscles expressing (iCUG)₄₈₀ and MBNL1 simultaneously, and no diffuse MBNL1 is detected in these nuclei (Fig. 3A–C). We also found that the average number of foci observed per nucleus is decreased in (iCUG)₄₈₀ flies that also overexpress MBNL1 (Fig. 3F).

Increased levels of CUGBP1 enhance expanded CUG toxicity

In cells expressing the CUG-containing expanded mRNA, the levels of CUGBP are increased (23,38). Higher steady state levels of CUGBP1 in DM1 correlate with alternative splicing defects in specific transcripts (39–41). We generated flies expressing human CUGBP1 and we used the DM1 fly model to investigate whether increased levels of CUGBP1 alter the (iCUG)₄₈₀ eye phenotype. Flies co-expressing CUGBP1 and (iCUG)₄₈₀ show an aggravated eye phenotype with enhanced ommatidial disorganization in comparison with flies expressing (iCUG)₄₈₀ alone (Fig. 4A and B). Flies overexpressing CUGBP1 alone show inter-ommatidial bristle loss, but little if any ommatidial disorganization (Fig. 4C); consequently we conclude that CUGBP1 overexpression enhances the (iCUG)₄₈₀ eye phenotype. Increasing the CUGBP1 levels in the *Drosophila* somatic muscles leads to a degenerative phenotype (Fig. 4F) similar to the phenotype caused by (iCUG)₄₈₀ with vacuolization and loss of muscle integrity (Fig. 4I). This phenotype complicates interpreting the effect of CUGBP on (iCUG)₄₈₀ muscle toxicity. However, co-expressing (iCUG)₄₈₀ and CUGBP1 leads to an increased wasting of the muscles compared to animals expressing only (iCUG)₄₈₀ (compare Fig. 4E and H with D and G).

CUGBP1 does not localize to expanded CUG-containing nuclear foci in DM1 cells (18,31). We monitored the distribution of CUGBP1 in larval muscles co-expressing (iCUG)₄₈₀ and CUGBP1. Consistent with the existing data, we found that CUGBP1 localizes to the nuclei of muscle cells but is not recruited to the (iCUG)₄₈₀ nuclear foci (Fig. 4K).

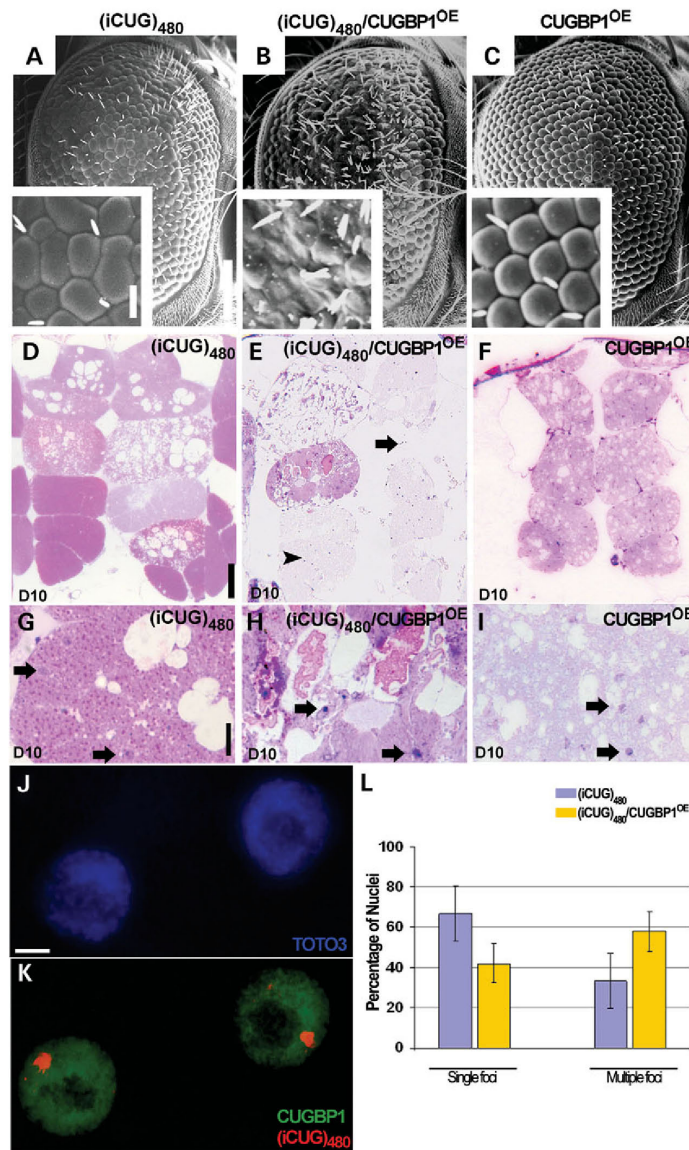


Figure 4. CUGBP1 enhances the eye and muscle phenotypes caused by (iCUG)₄₈₀, and does not accumulate in nuclear foci. (A–C) Eye SEM images of flies expressing (iCUG)₄₈₀, (iCUG)₄₈₀ and CUGBP1, or CUGBP1 alone. The (iCUG)₄₈₀ eye phenotype (A), is enhanced by CUGBP1 overexpression (B). Expression of CUGBP1 by itself in the eye shows inter-ommatidial bristle loss, but little if any ommatidial disorganization (C). (D–I) Transversal semi-thin sections of adult IFM expressing (iCUG)₄₈₀, (iCUG)₄₈₀ and CUGBP1, or CUGBP1 alone. Ten-day-old flies expressing (iCUG)₄₈₀ show vacuolization of the tissue (D) and loss of muscle fibre structure (arrows point nuclei, G). Co-expression of (iCUG)₄₈₀ and CUGBP1 causes a stronger wasting of the muscle in flies of the same age. Notice the absence of some muscle packs (arrow) and the lax distribution of myofibrils in the rest of the tissue (arrowhead) (E). Higher magnification shows a dramatic loss of muscle structure (arrows point nuclei, H). Expression of CUGBP1 alone shows a phenotype similar to the phenotype of (iCUG)₄₈₀ flies shown in D with vacuolization (F) and disorganization of fibres (arrows point nuclei, I). (J and K) Images of nuclei from larval somatic muscle co-expressing (iCUG)₄₈₀ and CUGBP1 after immunofluorescence and *in situ* hybridization. Muscles are stained with TOTO3 to visualize the nuclei (J, blue). CUGBP1 is distributed throughout the nuclei (K, green) and does not accumulate in (iCUG)₄₈₀ nuclear foci (K, red). (L) Comparative quantification of nuclei with single versus multiple foci in flies expressing (iCUG)₄₈₀ alone or together with CUGBP1. In nuclei expressing CUGBP1, the average of multiple foci per nucleus is higher than in (iCUG)₄₈₀ controls. Error bars represent standard deviation. Data was analyzed using Student's *t* (*P* = 0.006 in both groups). Scale bars: (A–C) 100 μ m (insets 10 μ m), (D–F) 50 μ m, (G–I) 10 μ m, (J–L) 5 μ m. Genotypes are A: w; *gmr*-GAL4/UAS-*LacZ*; UAS-(iCUG)₄₈₀[*M5T*]/+; B: w; *gmr*-GAL4/UAS-CUGBP1[*M2A*]; UAS-(iCUG)₄₈₀[*M5T*]/+; C: w; *gmr*-GAL4/UAS-CUGBP1[*M2A*]/+; D, G: w; +; *Mhc*-GAL4/UAS-(iCUG)₄₈₀[*M5T*]; E, H: w; UAS-CUGBP1[*M2A*]/+; *Mhc*-GAL4/UAS-(iCUG)₄₈₀[*M5T*]; F, I: w; UAS-CUGBP1[*M2A*]/+; *Mhc*-GAL4/+; J–L: w; UAS-CUGBP1[*M2N*]/+; *Mhc*-GAL4/UAS-(iCUG)₄₈₀[*M5T*].

Interestingly, overexpression of CUGBP1 increases the average number of (iCUG)₄₈₀ foci observed per nucleus (Fig. 4L).

DISCUSSION

Several independent lines of evidence support the hypothesis that DM1 pathogenesis is a consequence of RNA gain-of-function toxicity. A second type of myotonic dystrophy (DM2) is caused by a related but distinct mutation (expansion of CCTG repeats) in a locus unrelated to the DM1 gene (16). In addition, a transgenic mouse model expressing expanded CUG in skeletal muscle displays myotonia and myopathy (17), and a *muscleblind* knockout also shows many of the pathological features of DM1 (26), supporting the idea that expanded CUG titrates muscleblind proteins.

To further investigate the RNA gain-of-function hypothesis and the mechanisms of expanded CUG-induced pathogenesis, we have generated a transgenic *Drosophila* DM1 model carrying an interrupted (CTG)₄₈₀ repeat. Other models of human disease in *Drosophila* have proved to be a useful tool to investigate the disease mechanisms (42–44). A previously reported DM1 *Drosophila* model generated with (CTG)₁₆₂ repeats showed accumulation of the expanded repeats in nuclear foci and co-localization with muscleblind protein, but did not show pathological phenotypes in muscle or other tissues (35). Likewise, flies generated in our laboratory expressing (CUG)₂₀₀ did not show abnormal phenotypes in the eye (data not shown) or in the muscle (Supplementary Material Fig. S1). Thus, it appears that fewer than 200 CUG repeats are not enough to trigger obvious pathogenic effects in *Drosophila*.

As reported here, we found that expression of a (iCUG)₄₈₀ RNA leads to dysfunction and progressive degeneration of somatic muscle. In addition, we find that the expanded transcripts accumulate in nuclear foci in muscle cells. These foci are an important hallmark of DM1 and their presence in fly muscle nuclei supports the validity of the DM1 *Drosophila* model. We find that overexpression of MBNL1 reduces the percentage of nuclei containing multiple foci (Fig. 3F), whereas, overexpression of GUGBP1 increases this percentage (Fig. 4L). Thus, we find a positive correlation between the number of foci per nuclei and severity of the muscle degenerative phenotype. We also report that expression of (iCUG)₄₈₀ in the *Drosophila* eye causes a phenotype that correlates with the muscle phenotype. The eye phenotype provides us with a convenient primary assay for future large-scale genetic screens aimed to identify additional modifiers of (iCUG)₄₈₀-induced toxicity.

Two families of RNA-BP have been shown to be implicated in DM1 pathogenesis: CELF (CUGBP and ETR-3-like factors) proteins and MBNL proteins (21,31,45). CUGBP and MBNL proteins are antagonistic splicing regulators of two transcripts misregulated in DM1 tissues: cTNT and IR (28,39,40). In DM1, the splicing patterns observed for these transcripts are consistent with increased levels and activity of CUGBP1 (39–41,46) and decreased levels of MBNL proteins (30).

Mouse models expressing CUGBP1 in the heart show disrupted splicing of transcripts (27). Overexpression of

CUGBP1 in mice skeletal muscle reproduces some of the muscle histopathology phenotypes observed in DM1 muscle (36). Based on these findings, it could be predicted that increased levels of CUGBP1 would result in an enhancement of the phenotype induced by the expanded RNA. We find that expression of CUGBP1 alone in *Drosophila* somatic muscles leads to a muscle-wasting phenotype similar to the phenotype observed with expression of (iCUG)₄₈₀. This observation is consistent with previous reports describing the effect of CUGBP1 expression in mice (27,36). In agreement with data observed in DM1 cells (18,31), the nuclei of *Drosophila* muscle cells expressing both CUGBP1 and (iCUG)₄₈₀ show a diffuse pattern of CUGBP1 accumulation but no aggregation or co-localization with the expanded RNA-containing foci. Co-expression of CUGBP1 and (iCUG)₄₈₀ leads to aggravated muscle wasting and degeneration phenotypes. Because of the phenotype caused by CUGBP1 alone, it is difficult to make a strong conclusion from the enhancement of the (iCUG)₄₈₀ muscle phenotype; however, these results are consistent with the idea that the increased CUGBP activity in DM1 tissue is relevant for DM1 pathogenesis.

All three mammalian MBNL proteins identified (MBNL1, MBNL2 and MBNL3) have been shown to co-localize with the expanded RNA-containing nuclear foci *in vivo* (21,22,31). We find that MBNL1 shows a diffuse distribution in the nuclei of *Drosophila* muscles. However, in the presence of (iCUG)₄₈₀, MBNL1 accumulates in the nuclear foci and is depleted from the rest of the nucleus.

The phenotype of *muscleblind* knockout mice strongly supports the hypothesis that sequestration and loss of muscleblind normal function is a critical factor in DM1 pathogenesis. This hypothesis predicts that altering the levels of muscleblind proteins should modulate the phenotypes induced by expanded CUG repeats. We have tested this prediction and found that a heterozygous loss-of-function allele of *Drosophila muscleblind* enhances the eye phenotype. More importantly, we find that overexpression of human muscleblind is able to dramatically suppress both the somatic muscle and eye (iCUG)₄₈₀ phenotypes. The degree of suppression is dependent on MBNL1 overexpression levels, as too much MBNL1 also causes muscle pathology. Thus, it appears that the steady state levels of MBNL, like those of CUGBP1, are important for normal muscle physiology. These results support the MBNL sequestration model in DM1 pathogenesis and also constitute proof of the principle that expanded CUG-induced toxicity can be suppressed.

MATERIALS AND METHODS

Construct generation and transgenic *Drosophila* lines

The UAS-(iCTG)₄₈₀ construct was generated by cloning interrupted repeats composed of repeating units of the sequence (CTG)₂₀CTCGA (39) into the pUAST *Drosophila* expression vector (37). (CTG)₂₀ were also cloned into the pUAST vector to generate transgenic lines. The UAS-MBNL1 and UAS-CUGBP1 constructs were generated by cloning the 41 kDa isoform of MBNL1 with an N-terminal Xpress tag and human CUGBP1, respectively, into the pUAST vector. The UAS-(CTG)₂₀₀ construct was generated by cloning a 1.4 kb

fragment of the DMPK 3' UTR containing 200 CTG repeats into the pUAST-GFP vector. Transgenic *Drosophila* lines were obtained by injecting these constructs in embryos following standard methods. We generated 13 UAS-(iCTG)₄₈₀, 13 UAS-(CTG)₂₀, 10 UAS-MBNL1, 7 UAS-CUGBP1 and 13 UAS-(CTG)₂₀₀ transgenic lines.

The UAS-LacZ, *gmr*-GAL4 and *mbl*^{P15144} were obtained from Bloomington Stock Center (Indiana, USA). *Mhc*-GAL4 was obtained from G. Davis (UCSF).

Scanning electron microscopy of *Drosophila* eyes

Flies processing for SEM as well as image acquisition were performed following the previously published procedures (47).

Semi-thin sectioning of *Drosophila* adult thoraxes

Adult thoraxes were dissected out, fixed overnight in glutaraldehyde–paraformaldehyde–cacodylate buffer, washed, fixed for 2 h at 4°C in 1% osmium tetroxide, dehydrated in ethanol, embedded in EPON for transversal semi-thin sections, and then stained with Multiple Stain Solution (Polysciences). Sectioned muscles of different genotypes to be compared with one another were stained simultaneously to ensure the same amount of staining. At least eight flies per genotype were sectioned for each observation.

In situ hybridization and immunofluorescence staining of *Drosophila* larval muscles

For immunofluorescence staining, larval or adult muscles were dissected and fixed in 4% formaldehyde. Following standard procedures, the tissue was incubated with anti-CUGBP1 3B1 (1:500, Upstate), anti-Xpress tag (1:200, Invitrogen), anti-CBP (1:1000 provided by Dr Mattias Mannervik), anti-LaminC (1:50, Hybridoma Bank), Phalloidin (1:200, Sigma). Secondary antibodies were obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories and Molecular Probes. For combined *in situ* hybridization and immunofluorescence staining after the fixation, the tissue was fixed again with 40% formamide/1 × SSC following hybridization with Cy3-labelled (CAG)₅ probe (1 ng/μl) and washed to continue with the immunofluorescence staining. We studied eight larvae per genotype and 50 nuclei per larvae. For comparative quantification of the nuclear foci, we studied at least four larvae per genotype and an average of 200 nuclei per larvae.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at HMG Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Kwang Choi's Lab at Baylor College of Medicine for assistance with semi-thin sections and Dr Mattias Mannervik for kindly providing anti-dCBP antibody, J. Barrish at the Texas Children's Hospital for help with the SEM and R. Atkinson for advice with the confocal microscopy (supported by MRDDRC and HHMI). We also thank

D. Bundman for technical assistance. This work was supported by NIH (NS42179) and seed funding from the Hunter Research Fund to J.B. and funding from the Muscular Dystrophy Association and NIH (AR45653) to T.C.

Conflict of Interest statement. None declared.

REFERENCES

- Harper, P.S., Brook, J.D. and Newman, E. (2001) *Myotonic dystrophy*, 3rd edn. Saunders, London.
- Fu, Y.H., Pizzuti, A., Fenwick, R.G., Jr, King, J., Rajnarayan, S., Dunne, P.W., Dubel, J., Nasser, G.A., Ashizawa, T., de Jong, P. *et al.* (1992) An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science*, **255**, 1256–1258.
- Brook, J.D., McCurrach, M.E., Harley, H.G., Buckler, A.J., Church, D., Aburatani, H., Hunter, K., Stanton, V.P., Thirion, J.P., Hudson, T. *et al.* (1992) Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell*, **68**, 799–808.
- Mahadevan, M., Tsilfidis, C., Sabourin, L., Shutler, G., Amemiya, C., Jansen, G., Neville, C., Narang, M., Barcelo, J., O'Hoy, K. *et al.* (1992) Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science*, **255**, 1253–1255.
- Fu, Y.H., Friedman, D.L., Richards, S., Pearlman, J.A., Gibbs, R.A., Pizzuti, A., Ashizawa, T., Perryman, M.B., Scarlato, G., Fenwick, R.G., Jr *et al.* (1993) Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy. *Science*, **260**, 235–238.
- Hofmann-Radvanyi, H., Lavedan, C., Rabes, J.P., Savoy, D., Duros, C., Johnson, K. and Junien, C. (1993) Myotonic dystrophy: absence of CTG enlarged transcript in congenital forms, and low expression of the normal allele. *Hum. Mol. Genet.*, **2**, 1263–1266.
- Novelli, G., Gennarelli, M., Zelano, G., Pizzuti, A., Fattorini, C., Caskey, C.T. and Dallapiccola, B. (1993) Failure in detecting mRNA transcripts from the mutated allele in myotonic dystrophy muscle. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **29**, 291–297.
- Wang, Y.H., Amirhaeri, S., Kang, S., Wells, R.D. and Griffith, J.D. (1994) Preferential nucleosome assembly at DNA triplet repeats from the myotonic dystrophy gene. *Science*, **265**, 669–671.
- Otten, A.D. and Tapscott, S.J. (1995) Triplet repeat expansion in myotonic dystrophy alters the adjacent chromatin structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 5465–5469.
- Jansen, G., Groenen, P.J., Bachner, D., Jap, P.H., Coerwinkel, M., Oerlemans, F., van den Broek, W., Gohlsch, B., Pette, D., Plomp, J.J. *et al.* (1996) Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice. *Nat. Genet.*, **13**, 316–324.
- Reddy, S., Smith, D.B., Rich, M.M., Lefterovich, J.M., Reilly, P., Davis, B.M., Tran, K., Rayburn, H., Bronson, R., Cros, D. *et al.* (1996) Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy. *Nat. Genet.*, **13**, 325–335.
- Berul, C.I., Maguire, C.T., Gehrmann, J. and Reddy, S. (2000) Progressive atrioventricular conduction block in a mouse myotonic dystrophy model. *J. Interv. Card. Electrophysiol.*, **4**, 351–358.
- Klesert, T.R., Cho, D.H., Clark, J.I., Maylie, J., Adelman, J., Snider, L., Yuen, E.C., Soriano, P. and Tapscott, S.J. (2000) Mice deficient in Six5 develop cataracts: implications for myotonic dystrophy. *Nat. Genet.*, **25**, 105–109.
- Sarkar, P.S., Appukuttan, B., Han, J., Ito, Y., Ai, C., Tsai, W., Chai, Y., Stout, J.T. and Reddy, S. (2000) Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts. *Nat. Genet.*, **25**, 110–114.
- Ranum, L.P., Rasmussen, P.F., Benzow, K.A., Koob, M.D. and Day, J.W. (1998) Genetic mapping of a second myotonic dystrophy locus. *Nat. Genet.*, **19**, 196–198.
- Liquori, C.L., Ricker, K., Moseley, M.L., Jacobsen, J.F., Kress, W., Naylor, S.L., Day, J.W. and Ranum, L.P. (2001) Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science*, **293**, 864–867.
- Mankodi, A., Logigian, E., Callahan, L., McClain, C., White, R., Henderson, D., Krym, M. and Thornton, C.A. (2000) Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science*, **289**, 1769–1773.

18. Michalowski, S., Miller, J.W., Urbinati, C.R., Paliouras, M., Swanson, M.S. and Griffith, J. (1999) Visualization of double-stranded RNAs from the myotonic dystrophy protein kinase gene and interactions with CUG-binding protein. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 3534–3542.
19. Napierala, M. and Krzyzosiak, W.J. (1997) CUG repeats present in myotonin kinase RNA form metastable 'slippery' hairpins. *J. Biol. Chem.*, **272**, 31079–31085.
20. Taneja, K.L., McCurrach, M., Schalling, M., Housman, D. and Singer, R.H. (1995) Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues. *J. Cell. Biol.*, **128**, 995–1002.
21. Miller, J.W., Urbinati, C.R., Teng-Umuay, P., Stenberg, M.G., Byrne, B.J., Thornton, C.A. and Swanson, M.S. (2000) Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)_n expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO J.*, **19**, 4439–4448.
22. Fardaei, M., Rogers, M.T., Thorpe, H.M., Larkin, K., Hamshire, M.G., Harper, P.S. and Brook, J.D. (2002) Three proteins, MBNL, MBL and MBXL, co-localize *in vivo* with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells. *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 805–814.
23. Timchenko, L.T., Miller, J.W., Timchenko, N.A., DeVore, D.R., Datar, K.V., Lin, L., Roberts, R., Caskey, C.T. and Swanson, M.S. (1996) Identification of a (CUG)_n triplet repeat RNA-binding protein and its expression in myotonic dystrophy. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 4407–4414.
24. Artero, R., Prokop, A., Paricio, N., Begemann, G., Pueyo, I., Mlodzik, M., Perez-Alonso, M. and Baylies, M.K. (1998) The muscleblind gene participates in the organization of Z-bands and epidermal attachments of *Drosophila* muscles and is regulated by Dmef2. *Dev. Biol.*, **195**, 131–143.
25. Begemann, G., Paricio, N., Artero, R., Kiss, I., Perez-Alonso, M. and Mlodzik, M. (1997) Muscleblind, a gene required for photoreceptor differentiation in *Drosophila*, encodes novel nuclear Cys3His-type zinc-finger-containing proteins. *Development*, **124**, 4321–4331.
26. Kanadia, R.N., Johnstone, K.A., Mankodi, A., Lungu, C., Thornton, C.A., Esson, D., Timmers, A.M., Hauswirth, W.W. and Swanson, M.S. (2003) A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science*, **302**, 1978–1980.
27. Ho, T.H., Bundman, D., Armstrong, D.L. and Cooper, T.A. (2005) Transgenic mice expressing CUG-BP1 reproduce splicing mis-regulation observed in myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 1539–1547.
28. Ho, T.H., Charlet, B.N., Poulos, M.G., Singh, G., Swanson, M.S. and Cooper, T.A. (2004) Muscleblind proteins regulate alternative splicing. *EMBO J.*, **23**, 3103–3112.
29. Ho, T.H., Savkur, R.S., Poulos, M.G., Mancini, M.A., Swanson, M.S. and Cooper, T.A. (2005) Colocalization of muscleblind with RNA foci is separable from mis-regulation of alternative splicing in myotonic dystrophy. *J. Cell. Sci.*, **118**, 2923–2933.
30. Ladd, A.N., Stenberg, M.G., Swanson, M.S. and Cooper, T.A. (2005) Dynamic balance between activation and repression regulates pre-mRNA alternative splicing during heart development. *Dev. Dyn.*, **233**, 783–793.
31. Fardaei, M., Larkin, K., Brook, J.D. and Hamshire, M.G. (2001) *In vivo* co-localisation of MBNL protein with DMPK expanded-repeat transcripts. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 2766–2771.
32. Mankodi, A., Urbinati, C.R., Yuan, Q.P., Moxley, R.T., Sansone, V., Krym, M., Henderson, D., Schalling, M., Swanson, M.S. and Thornton, C.A. (2001) Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 2165–2170.
33. Jiang, H., Mankodi, A., Swanson, M.S., Moxley, R.T. and Thornton, C.A. (2004) Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons. *Hum. Mol. Genet.*, **13**, 3079–3088.
34. Mankodi, A., Lin, X., Blaxall, B.C., Swanson, M.S. and Thornton, C.A. (2005) Nuclear RNA foci in the heart in myotonic dystrophy. *Circ. Res.*, **97**, 1152–1155.
35. Houseley, J.M., Wang, Z., Brock, G.J., Soloway, J., Artero, R., Perez-Alonso, M., O'Dell, K.M. and Monckton, D.G. (2005) Myotonic dystrophy associated expanded CUG repeat muscleblind positive ribonuclear foci are not toxic to *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 873–883.
36. Timchenko, N.A., Patel, R., Iakova, P., Cai, Z.J., Quan, L. and Timchenko, L.T. (2004) Overexpression of CUG triplet repeat-binding protein, CUGBP1, in mice inhibits myogenesis. *J. Biol. Chem.*, **279**, 13129–13139.
37. Brand, A.H. and Perrimon, N. (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, **118**, 401–415.
38. Roberts, R., Timchenko, N.A., Miller, J.W., Reddy, S., Caskey, C.T., Swanson, M.S. and Timchenko, L.T. (1997) Altered phosphorylation and intracellular distribution of a (CUG)_n triplet repeat RNA-binding protein in patients with myotonic dystrophy and in myotonin protein kinase knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 13221–13226.
39. Philips, A.V., Timchenko, L.T. and Cooper, T.A. (1998) Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science*, **280**, 737–741.
40. Savkur, R.S., Philips, A.V. and Cooper, T.A. (2001) Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat. Genet.*, **29**, 40–47.
41. Charlet, B.N., Savkur, R.S., Singh, G., Philips, A.V., Grice, E.A. and Cooper, T.A. (2002) Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol. Cell.*, **10**, 45–53.
42. Zoghbi, H.Y. and Botas, J. (2002) Mouse and fly models of neurodegeneration. *Trends Genet.*, **18**, 463–471.
43. Fortini, M.E. and Bonini, N.M. (2000) Modeling human neurodegenerative diseases in *Drosophila*: on a wing and a prayer. *Trends Genet.*, **16**, 161–167.
44. Shulman, J.M., Shulman, L.M., Weiner, W.J. and Feany, M.B. (2003) From fruit fly to bedside: translating lessons from *Drosophila* models of neurodegenerative disease. *Curr. Opin. Neurol.*, **16**, 443–449.
45. Ladd, A.N., Charlet, N. and Cooper, T.A. (2001) The CELF family of RNA-binding proteins is implicated in cell-specific and developmentally regulated alternative splicing. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 1285–1296.
46. Timchenko, N.A., Cai, Z.J., Welm, A.L., Reddy, S., Ashizawa, T. and Timchenko, L.T. (2001) RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1. *J. Biol. Chem.*, **276**, 7820–7826.
47. Fernandez-Funez, P., Nino-Rosales, M.L., de Gouyon, B., She, W.C., Luchak, J.M., Martinez, P., Turiegano, E., Benito, J., Capovilla, M., Skinner, P.J. *et al.* (2000) Identification of genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration. *Nature*, **408**, 101–106.